LONDON SCHOOL OF HYGIENE ★ TROPICAL MEDICINE
LIBRARY
- 1 JUN 1987

95798

Prof. Dr. M. Neisser
FRANKFURT a. M.

LONDON SCHOOL OF HYGIENE AND TROPICAL MEDICINE
LIBRARY
4 JUN 1987

III.

Die allgemeinen Methoden der Bakteriologie.

Von

Prof. Dr. **E. Friedberger** und Dr. **H. Reiter**,
Berlin.

Mit 150 Figuren im Text.

I. Kapitel.

Methoden der Bakterienbetrachtung.

1. Das Mikroskop.

Das für die Zwecke der bakteriologischen Untersuchung zur Verwendung kommende Mikroskop erfordert sowohl, was das Stativ, wie vor allem auch den optischen Apparat anlangt, eine Reihe von besonderen Einrichtungen, deren das zu anatomischen Untersuchungen gebräuchliche, wenigstens für die gewöhnlichen Zwecke, nicht bedarf.

Bezüglich des Stativs ist erforderlich, daß sich der Tubus durch eine gröbere Zahneinrichtung an dem Oberteil des Stativs auf- und abbewegen läßt; eine Mikrometerschraube muß die feine Einstellung bis zu 0,001 mm gestatten. An dem Unterteil des Stativs ist eine Kippvorrichtung angebracht, die gestattet, den Tubus in eine schräge oder horizontale Richtung zu bringen, wie dies beispielsweise zur Photographie meist geschieht.

Der am Kippstück verschiebbar befestigte Beleuchtungsapparat nach Abbe [1 u. 2] (Fig. 1) setzt sich aus Spiegel, Irisblende und Kondensorsystem zusammen:

Kondensor.

Er besteht aus einer bikonvexen und einer halbkugeligen Linse. Der Brennpunkt der Kondensorlinsen liegt für parallele Strahlen sehr nahe der Objektebene, wodurch ein Strahlenkegel von sehr großem Oeffnungswinkel zu dem Objektiv gelangt.

Der ganze Beleuchtungsapparat muß in der Richtung der optischen Achse (d. h. nach oben und unten) verschiebbar sein, da der Vereinigungspunkt der von der Lichtquelle ausgehenden Strahlen, der sich möglichst nahe an der Objektebene befinden soll, je nach der Entfernung der Lichtquelle verschieden hoch liegt.

Spiegel.

Die meisten Strahlen werden dann in dem Objekt vereinigt, wenn sie parallel die Kondensorlinse treffen. Dies ist aber bei Verwendung des Hohlspiegels nicht der Fall, er liefert konvergente

Strahlen. Daher ist bei dem Gebrauch des Abbeschen Beleuchtungsapparates in der Regel der Planspiegel zu benutzen, der Hohlspiegel nur bei naher Lichtquelle und Anwendung schwacher Vergrößerung.

Blende.

Nicht für alle Zwecke ist die bei Verwendung des Beleuchtungsapparates erzielbare maximale Beleuchtung des Objekts angezeigt. Man unterscheidet nach R. Koch [24 u. 25] zwei Arten mikroskopischer Bilder, das Strukturbild oder Diffraktionsbild und das Farbenbild oder Absorptionsbild. Das Strukturbild kommt durch

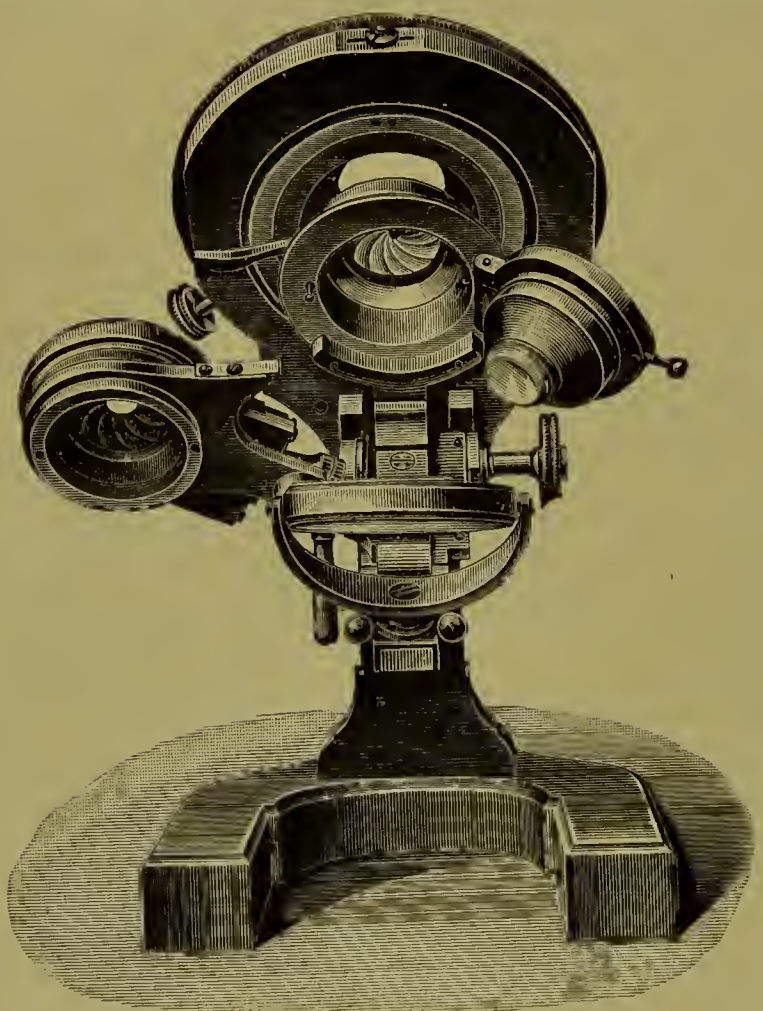


Fig. 1.

Differenzen im Lichtbrechungsvermögen der einzelnen Teile des Präparates mit der Einschlußmasse zustande. Anders das Farbenbild, das nicht durch Diffraktion der durchgehenden Strahlen, sondern durch Absorption der Strahlen an den gefärbten Elementen erzielt wird.

Es leuchtet ohne weiteres ein, daß für die Erzeugung des aus Linien und Schatten bestehenden Strukturbildes die maximale Beleuchtung ungeeignet ist. Hier ist der Kondensor ganz auszuschalten, was bei den neueren Mikroskopmodellen sehr bequem durch seitliches Herausklappen mittels eines Scharniergelenkes zu bewerkstelligen ist (s. Fig. 1), oder in seiner Wirkung durch die Einschaltung der eng-

gestellten Irisblende aufzuheben wird. Bei der Betrachtung gefärbter Präparate ist die Blende ganz zu öffnen, damit ein Beleuchtungskegel von möglichst großer Oeffnung erzielt wird, der das Strukturbild auslöscht.

Die Blenden befinden sich an einem Träger zwischen Spiegel und Kondensorlinse nahe dem Brennpunkt der letzteren.

Am Blendungsträger ist ein Zahn- und Triebwerk angebracht, vermittels dessen die Irisblende zur Erzielung einer schiefen Beleuchtung nach der Seite verschoben werden kann.

Das Objektiv im allgemeinen.

Die Linsen des optischen Systems sollen aplanatisch sein, d. h. sowohl in bezug auf die sphärische wie chromatische Aberration korrigiert sein. Die sphärische Aberration kommt dadurch zustande, daß besonders bei den Linsen mit kleinem Krümmungsradius die Brennweite der Randstrahlen kleiner ist als die der Strahlen in der Nähe der optischen Achse. Auf diese Weise entstehen verschwommene Bilder.

Die chromatische Aberration ist Folge der verschiedenen Brennweite der beim Durchgang durch die Linse in die einzelnen Spektralfarben zerlegten Strahlen des homogenen Lichtes.

Durch geeignete Krümmung der Linsenoberfläche resp. durch Kombination verschiedener Glassorten und Zusammensetzung verschiedener Linsen lassen sich diese Fehler bedeutend verbessern.

Die bei der Verwendung derartiger aplanatischer Linsen noch bleibenden geringen Farbenreste, „sekundäres Spektrum", und die Reste der sphärischen Aberration werden durch die Apochromatobjektive in Verbindung mit den Kompensationsokularen beseitigt.

Da für die Betrachtung bakteriologischer Präparate mittlere Vergrößerungen in der Regel nicht zur Anwendung kommen, genügt in der Mehrzahl der Fälle ein schwaches Objektiv (Leitz 3, Zeiß AA) neben dem wichtigen Immsersionsobjektiv.

Die Immersionslinse.

Das Prinzip der Immersion wurde zuerst von Amici angewandt; die „homogene Immersion" rührt von Stephenson her. Vor allem aber hat sich Abbe hohe Verdienste um die Berechnung und Konstruktion der Immersionslinsen erworben.

Bei Verwendung der Immersionslinse wird zwischen Deckglasoberfläche und Frontlinse eine Flüssigkeit gebracht, die ungefähr den gleichen Brechungsexponenten wie Glas besitzt, nämlich Cedernöl („homogene Immersion") oder Wasser. Dadurch wird die Brechung an der unteren Linsenfläche gänzlich aufgehoben und es gelangen Strahlen in das Objektiv, die sonst beim Uebertritt aus dem Deckglas in Luft vom Einfallslot abgelenkt und nicht in das Objektiv dringen würden.

Auf diese Weise ist es möglich, Strahlenkegel von größerem Oeffnungswinkel (der Winkel, den die Randstrahlen mit dem Brennpunkt der Linse als Scheitel bilden) als bei den gewöhnlichen Systemen („Trockensystemen") zu benutzen. Eine Linse mit an und für sich geringerem Oeffnungswinkel kann umgekehrt mehr Strahlen

aufnehmen, falls sie mit dem Objekt durch eine homogene Flüssigkeit verbunden ist, als eine Trockenlinse von größerem Oeffnungswinkel, weil bei dieser ein Teil der Strahlen durch Ablenkung verloren geht. Es kommt also für das „Auflösungsvermögen" eines Linsensystems neben dem Oeffnungswinkel noch vor allem der Brechungsexponent des zwischen Deckglas und Frontlinse befindlichen Mediums in Betracht. Der Oeffnungswinkel ist bei einem Trockensystem stets kleiner als 180°. 180° könnte er theoretisch betragen, wenn das Objekt in der unteren Linsenfläche läge. In diesem Falle wäre der Sinus des halben Oeffnungswinkels (gebildet von einem Randstrahl und der optischen Achse der Linse) = 1.

Bei der Verwendung der Immersion wird der Sinus entsprechend dem Brechungsexponenten des Immersionsmediums kleiner. Es können theoretisch um so viel größere Strahlenkegel benutzt werden, bis der Sinus des halben Oeffnungswinkels wieder = 1 ist. (Auf Luft reduziert Strahlenkegel von einem Oeffnungswinkel über 180°.)

Die Leistungsfähigkeit des optischen Apparates.

Der wesentliche Bestandteil des Mikroskops ist das Objektiv und die Vergrößerung in erster Linie von diesem abhängig. Zu starke Okulare sind in der Regel zu vermeiden, da sie nur die Fehler des Objektivs vergrößern.

Für die Leistungsfähigkeit des Objektivs und damit für die Leistungsfähigkeit des Mikroskops überhaupt sind die folgenden drei Momente zu berücksichtigen.

1. Das Vergrößerungsvermögen: es ist umgekehrt proportional der Brennweite des Objektivs.

2. Das Begrenzungsvermögen, d. h. das Vermögen, ein scharfes Bild ohne Farbenringe zu geben: es ist von der genauen Zentrierung der Linsen und Aufhebung der sphärischen und chromatischen Aberation abhängig.

3. Das Auflösungsvermögen, d. h. die Fähigkeit des Objektivs, die feineren Strukturen des Objekts zur Darstellung zu bringen. Das Auflösungsvermögen ist abhängig von der Größe der numerischen Apertur. Durch eine zu starke numerische Apertur wird jedoch andererseits wieder das Begrenzungsvermögen herabgesetzt.

Zur Prüfung des Begrenzungsvermögens lassen sich mikroskopische Schnitte verwenden, die aus scharf umgrenzten Elementen bestehen. Sehr gut kann man es an den Rändern gebrochener Exemplare von Pleurosigma angulatum studieren. Die Ränder müssen scharf sein und dürfen nur schmale Farbensäume haben.

Zur Prüfung des Auflösungsvermögens eignet sich gleichfalls diese Diatomee. Mit schwachen Vergrößerungen erscheint sie gestreift, bei stärkerer tritt Felderzeichnung auf, bei Wasserimmersion erscheinen regelmäßige Sechsecke und bei noch stärkerer Vergrößerung lösen sich die Sechsecke in Kreise auf, zwischen denen dunkle Punkte liegen.

Der Strahlengang (s. Fig. 2).

Die aus dem Kondensor unter einem Winkel, der um so größer, je weiter die Irisblende geöffnet ist, austretenden Strahlen treffen auf das Objekt PQ, von hier aus treten divergente Strahlenbüschel

in das Objektiv ein, verlassen dieses konvergierend, werden durch die Kollektivlinse des Okulars in der Blendenebene vereinigt und lassen hier ein reelles Bild Q^1 und P^1 des Gegenstandes PQ entstehen. Durch die Vorderlinse des Okulars werden die von den Punkten $Q^1 P^1$ ausgehenden Strahlen als parallele Büschel auf der Netzhaut eines auf unendlich akkommodierten Auges zu einem reellen Bild vereinigt.

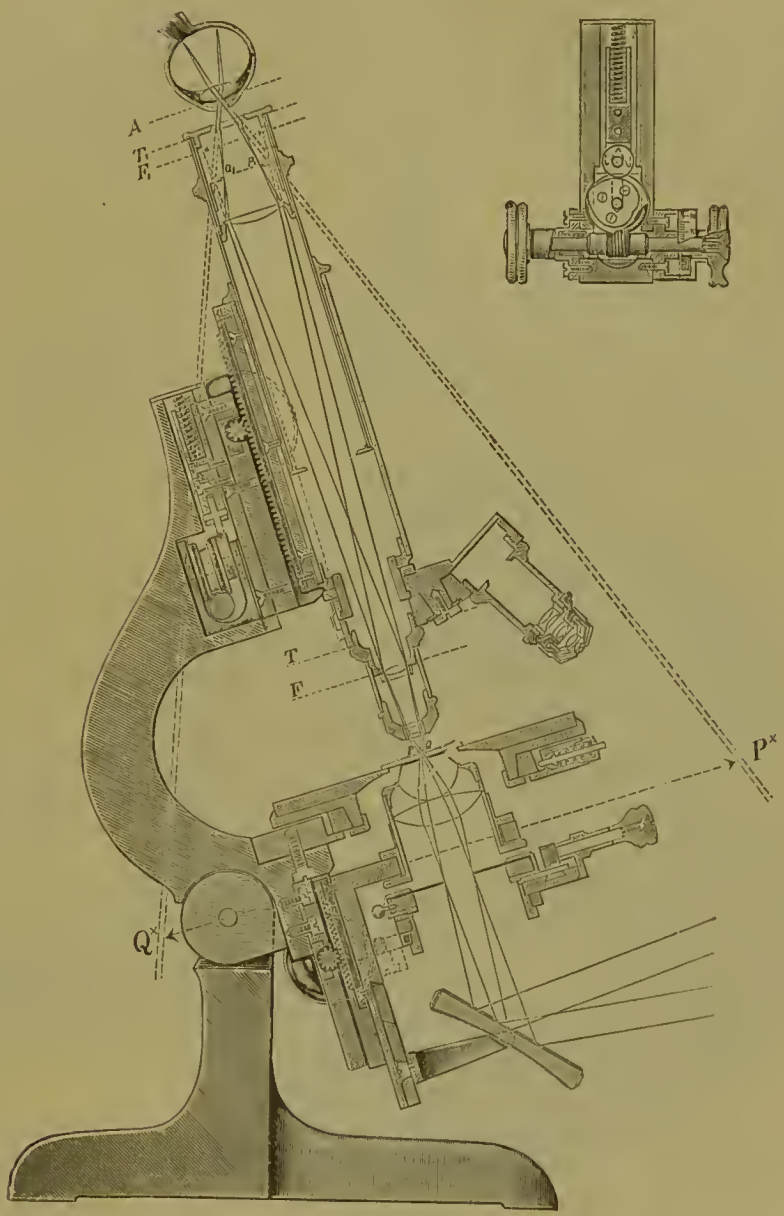


Fig. 2.

Die Entfernung zwischen der hinteren Brennebene des Objektives (F) und der vorderen Brennebene des Okulars (F^1) wird als optische Tubuslänge gleich Δ bezeichnet. Ist f^1 die Brennweite des Objektivs, f^2 die Brennweite des Okulars, so ergibt sich die Gesamtbrennweite f des Mikroskops nach folgender Gleichung $f = \frac{f^1 \cdot f^2}{\Delta}$.

Die Vergrößerung (V) des Mikroskops findet man nach folgender Gleichung $\frac{Q\times P\times}{PQ}=\frac{250}{f}$, wobei $Q\times P\times$ eine Linie darstellt, die man erhält, wenn man in der Entfernung der mittleren Sehweite von 250 mm vom Auge von dem nach rückwärts verlängerten, in das Auge fallenden Strahlenbüschel auf die Achse des Mikroskops ein Lot fällt.

Als Maß für die Leistungsfähigkeit des Mikroskops führte Abbe die sogenannte numerische Apertur ein. — Man findet sie nach der Gleichung $a=n\cdot sin\, u$, wobei u die Hälfte des größten Oeffnungswinkels der vom Objekt ausgehenden und durch das Objektiv hindurchtretenden Strahlenbüschel, n den Brechungsindex des das Objekt umgebenden Mediums bedeutet.

2. Nebenapparate des Mikroskops.

Beweglicher Objekttisch (Fig. 3).

Er gestattet neben einer genauesten Durchmusterung der Präparate eine jedesmalige leichte Wiedereinstellung bestimmter Objektpunkte. Die Verschiebung des Präparates erfolgt vermittels zweier

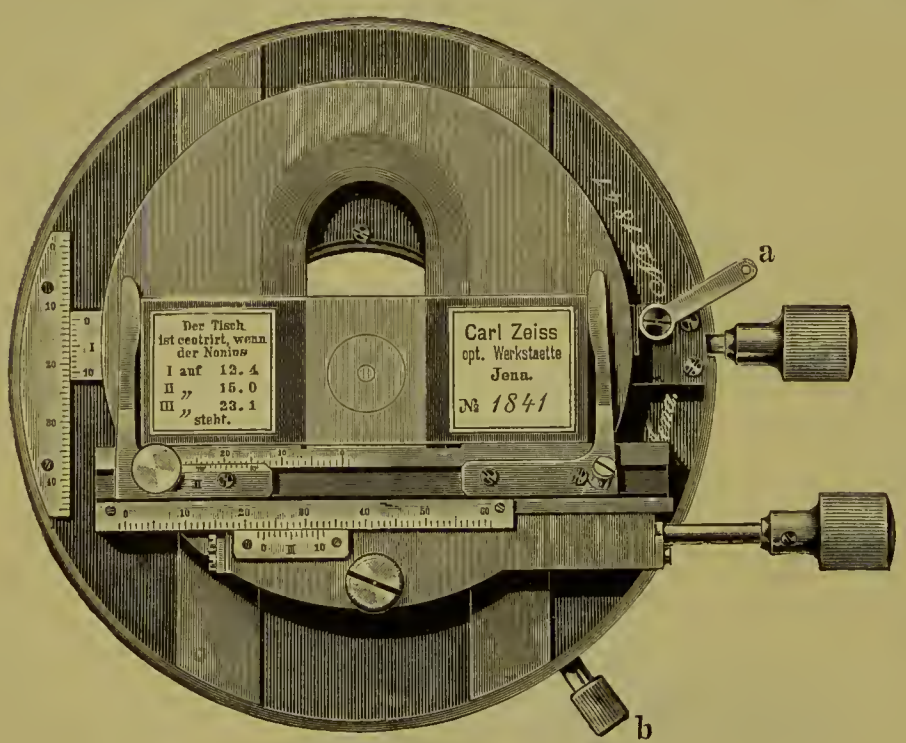


Fig. 3.

durch seitliche Triebschrauben beweglicher, zueinander senkrecht stehender Schlitten, die längs einer Skala laufen und mit Nonius versehen sind. Der von der Firma Zeiss gebaute große Kreuztisch besitzt noch eine dritte Skala nebst Nonius, um die Stellung des verschiebbaren Anschlages, an dem der Objektträger angedrückt wird, ablesen zu können. Mit Hilfe eines Zentrierglases, d. h. eines Objektträgers mit Strichkreuz, wird eine exakte Zentrierung des Tisches ermöglicht.

Heizbare Objekttische und Mikroskopbrutschränke.

Sie ermöglichen die Beobachtung lebender Bakterien unter konstanten, von der Außentemperatur unabhängigen Wärmegraden.

Der heizbare Objekttisch nach M. Schultze[46] (Fig. 4) besteht aus Metalltisch mit Kondensor und Thermometer, die Erwärmung erfolgt durch Flammen, die sich unter zwei seitlich am Tisch angebrachten flügelartigen Ansätzen befinden.

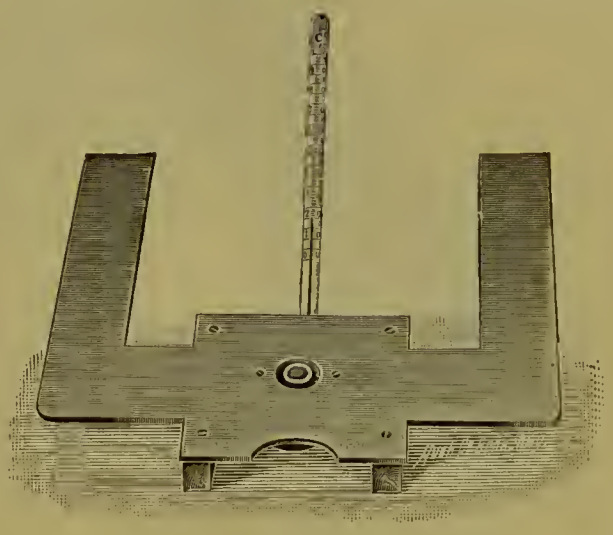


Fig. 4.

Der heizbare Objekttisch von L. Pfeiffer[35 u. 36] (Fig. 5) besteht aus einem Glaskasten, durch den entsprechend erwärmtes Wasser geleitet wird. Der Tisch kann auch direkt als Objektträger benutzt werden.

Bei dem Strickerschen heizbaren Objekttisch (Fig. 6) wird das erwärmte Wasser durch eine Metallkammer mit eingefügtem Thermometer geführt.

Kraus beschreibt einen neuen von Ingenieur Ehmann-Wien konstruierten heizbaren Objekttisch, der aus Glas mit Metallrahmen besteht und zum Reinigen auseinander genommen werden kann. Er wird durch eine kleine Warmwasserleitung gespeist. Durch einen Mikrobrenner wird Wasser in einem Siedegefäß erhitzt, steigt durch

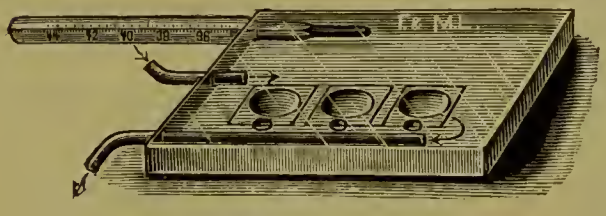


Fig. 5.

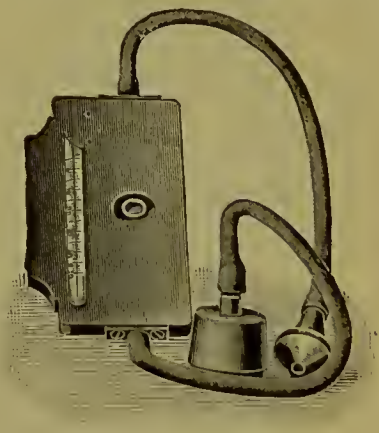


Fig. 6.

ein Steigerohr in ein Reservoir, in welchem sich der Thermoregulator für den Mikrobrenner befindet, geht durch einen Schlauch zum heizbaren Objekttisch, kühlt sich hierbei ab und wird durch das aufsteigende warme Wasser des Siedegefäßes angesogen. Die Objektträger liegen auf dem heizbaren Tisch auf und können auch mit Immersion untersucht werden.

Durch elektrischen Strom heizbare Objekttische wurden von Stein[56] und Kraus[27 u. 28] konstruiert. In dem hohlen Objekttisch nach Kraus liegt eine Silberspirale, die durch einen Batteriestrom erwärmt wird, und ihrerseits das den Objekttisch füllende Paraffinöl heizt. Die Regulierung erfolgt durch ein elektrisch einstellbares Kontaktthermometer.

Bei dem elektrisch heizbaren Objektträger von Zwintz und Thien[61] erfolgt die Regulierung der Temperatur durch eine Quecksilbersäule, die den Strom für den Heizwiderstand ausschalten kann.

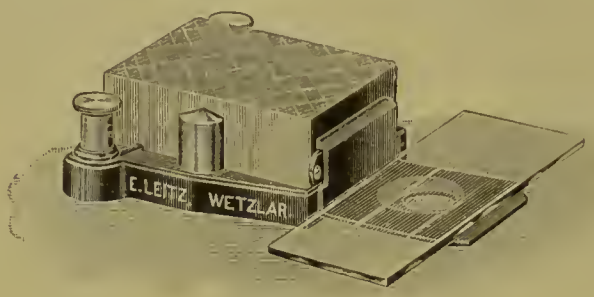


Fig. 7.

Ein elektrisch heizbarer Objekttisch, der gestattet, Temperaturen bis zu 1500° C zu erreichen, wurde von Jentzsch[20] angegeben. Für biologische Untersuchungen dürfte sich besonders der Apparat Nr. 4 des Autors eignen (Fig. 7).

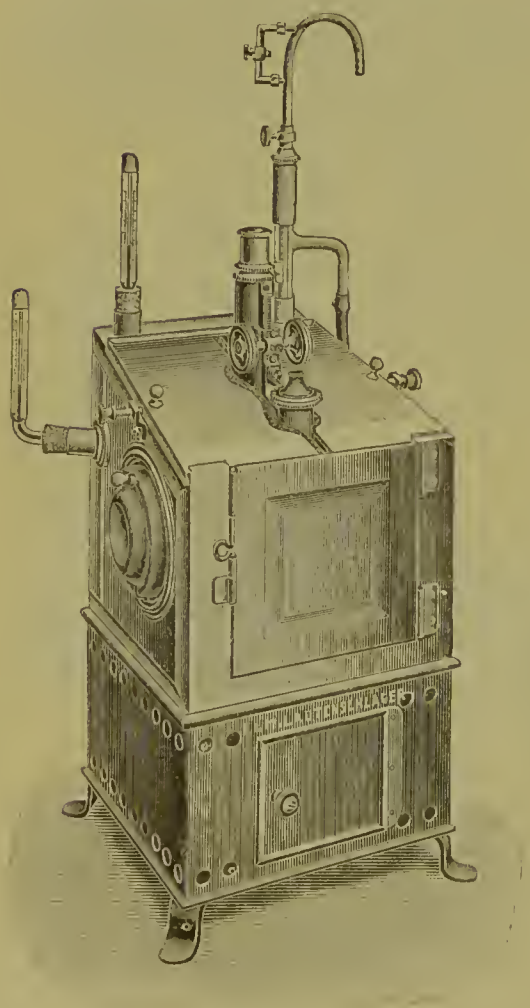


Fig. 8.

Die Schwankungen, denen die Temperatur in den gewöhnlichen heizbaren Objekttischen unter dem Einfluß der Außentemperatur ausgesetzt ist, werden am besten vermieden, wenn man das ganze Mikroskop, wie es Sachs („Lehrbuch der Botanik") zuerst getan hat, in einen nach Art eines Brutschrankes eingerichteten, doppelwandigen, heizbaren Kasten einsetzt, aus dem nur der Tubus herausragt (Fig. 8). Der Lichteinfall findet durch die aus Glas bestehende Vorderwand des Schrankes statt. Die Verschiebung der Objekte erfolgt von außen durch besondere Vorrichtungen. Die Regulierung und Heizung findet nach demselben Prinzip statt, wie es weiter unten für die gewöhnlichen Brutschränke geschildert wird. Derartige Mikroskopbrutschränke sind unter anderem von L. Pfeiffer[35 u. 36], Friedrich[9], Nuttal[33] und von Plehn[38] angegeben.

Zeichenapparate.

Bei allen Zeichenapparaten wird im Prinzip durch Brechung oder Reflexion an Prismen und Spiegeln das Bild auf die Zeichenfläche projiziert und gleichzeitig diese und das Objekt sichtbar gemacht.

Beim Abbeschen Zeichenapparat (Fig. 9) wird nach seiner Anbringung auf dem Okular die Zeichenfläche durch zweimalige Reflexion an einem seitlichen Planspiegel und der versilberten Hypothenusenfläche eines dem Okular aufsitzenden Prismas sichtbar gemacht. Das Objekt wird durch eine runde Oeffnung im Silberbelag

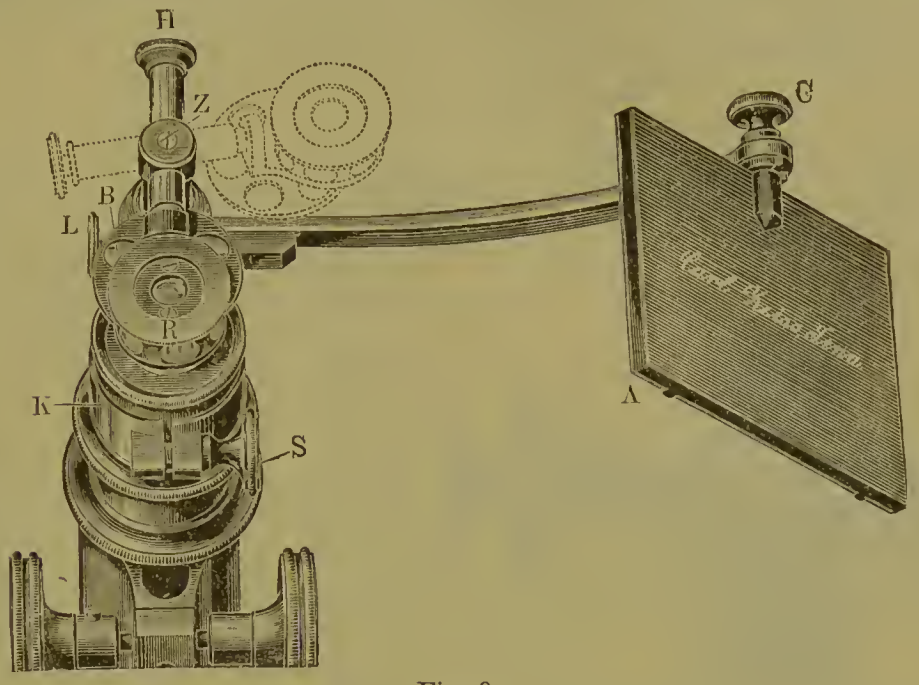


Fig. 9.

des Prismas mittels eines zweiten mit der Hypothenusenfläche an das erste angekitteten, durchsichtigen Prismas direkt beobachtet. Das Doppelprisma kann zur Seite geklappt werden, wodurch das Okular der direkten Beobachtung zugänglich wird. Das Licht der Zeichenfläche läßt sich durch Rauchgläser abdämpfen, die an der Mantelfläche einer über das Prisma gestülpten Kappe angebracht sind.

Fig. 10.

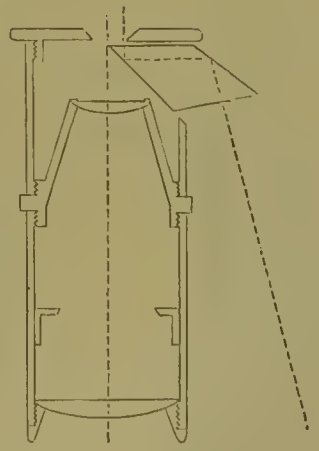


Fig. 11.

Bei einem von Schiemenz[45] eingeführten Zeichenokular (Fig. 10 und 11) ist ein Prisma in das Okular seitlich eingesetzt. Durch eine zweimalige totale Reflexion an den Seitenflächen des Prismas wird die

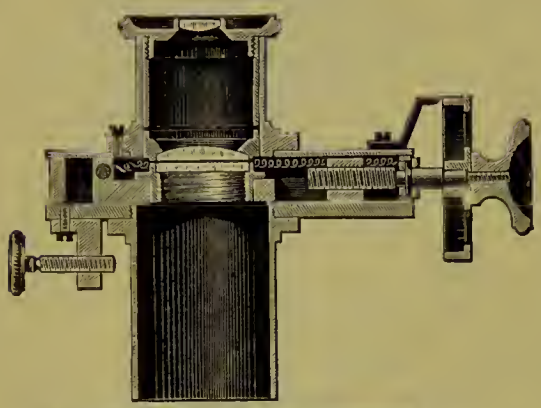
Zeichenfläche sichtbar gemacht. Dämpfung der Zeichenfläche geschieht durch Einschalten grauer Glasplättchen vor die Prismafläche.

Bei dem Zeichenokular von Oberhäuser befindet sich ein Prisma im Innern des (rechtwinklig abgebogenen) Okulars, ferner ein kleineres außerhalb. Die beiden Prismen reflektieren das Bild des Objektes so, daß es auf dem Papier gesehen wird. An dem kleineren Prisma, das schmäler ist als die Pupille des Auges, kann man vorbeisehen und so gleichzeitig den zeichnenden Bleistift beobachten.

Mikrometer.

Man unterscheidet Okular und Objektivmikrometer. Die Größe der Objekte wird mit Hilfe des Okularmikrometers gemessen, es ist zwischen Augen und Kollektivlinse des Okulars eingefügt, die Augenlinse ist zur scharfen Einstellung des Mikrometers verschiebbar. Das Okularmikrometer mißt nur die Größe des virtuellen Bildes, die wahre Größe des Objektes erhält man durch Multiplikation der Zahl der von ihm ausgefüllten Teilstriche des Okularmikrometers mit dem vorher bestimmten Mikrometerwert des Objektes.

Fig. 12.



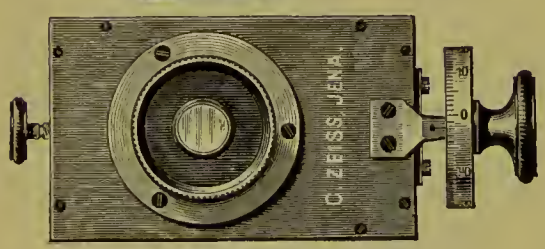


Fig. 13.

Für genauere Messungen dient das Okularschraubenmikrometer (Fig. 12 u. 13). Es besteht aus einem Ramsdenschen Okular von ca. 20 mm Brennweite oder einem geeigneten Kompensationsokular und einer Mikrometervorrichtung mit geteilter Trommel. Ein Intervall der Trommeleinteilung entspricht einer Verschiebung um 0,01 mm. Auch hier muß für jedes Objektiv der einem Trommelintervall entsprechende Wert mit Hilfe des Objektmikrometers genau bestimmt werden.

Fig. 14.

Okularzählnetze (nach Heim).

Sind auf der Oberfläche mit einem quadratischen Liniennetz durchzogen und dienen zur Keimzählung auf dicht bewachsenen Platten, zu Zählungen von Blutmischungen, zur Standardisierung von Vaccinen nach Wright etc.

Zeigerokular.

In diesen Okularen ist zwischen beiden Okularlinsen ein verschiebbarer Zeiger eingefügt, mit dessen Spitze man bestimmte Stellen des Präparates für Demonstrationszwecke markieren kann (Fig. 14).

Zeiger-Doppelokular (Edinger).

Das Doppelokular macht das von dem Objektiv entworfene Bild zwei Beobachtern gleichzeitig sichtbar, das Bild können die Beobachter mit einem im gemeinsamen Gesichtsfeld auftretenden Zeiger sich gegenseitig demonstrieren (Fig. 15).

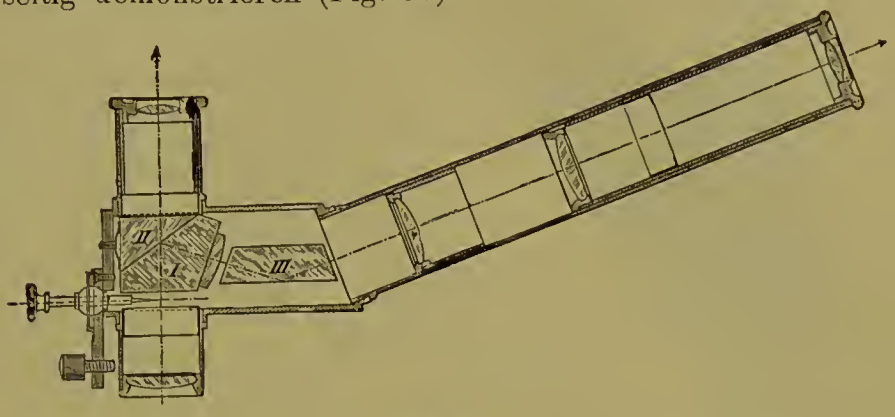


Fig. 15.

Zwischen Kollektivlinse und Augenlinse befindet sich ein Doppelprisma. — Seine Anordnung und der zwischen beiden befindliche dünne Luftraum bewirken eine teilweise Reflektion des Strahlenbündels. Während etwa $^2/_3$ des Lichtbündels seinen Weg geradlinig fortsetzt, wird das reflektierte Bündel mittels eines dritten Prismas dem zweiten Beobachter zugängig gemacht.

Objektmarkierer (Fig. 16).

Er soll die Wiederauffindung einer bestimmten Stelle des Präparates erleichtern. Nachdem man das Objekt in das Gesichtsfeldzentrum eingestellt hat, vertauscht man das Objektiv mit dem Objektmarkierer und ritzt mit seiner Diamantspitze um das Objekt einen kleinen Kreis in das Deckglas.

Apparat von Sachs-Müke[42]: Er besteht aus einem dem Oelimmersionssystem angepaßten Gestell, in dem sich 2 zur Linsenachse parallel verschiebbare, mit scharfen, genau zentrisch gearbeiteten Spitzen versehene Stifte befinden, die nach Einstellung des Linsensystems auf den seitlich des Präparates mit Papier oder dgl. beklebten Objektträger herabgeschraubt werden und dort bleibende Eindrücke hinterlassen.

Fig. 16.

Mikroskopierlampe.

Um bei künstlicher Beleuchtung ein möglichst großes Bild der Lichtquelle auf den Spiegel zu werfen, kann man zwischen Mikroskop und Lampe eine mit Wasser gefüllte Glaskugel (Schusterkugel) oder eine Konvexlinse eventuell mit Irisblende aufstellen.

Eine dem Tageslicht sehr nahe kommende künstliche Beleuchtung wird durch die Koch-Wolzsche Mikroskopierlampe mit Zirkonleuchtkörper (nach Schiefferdecker) erreicht. Der Zylinder der Lampe ist

von einem innen geschwärzten Schornstein umgeben. Im Innern des Schornsteins ist ein Reflektor angebracht und gegenüber ein horizontal eingesetzter Blechzylinder. Dieser ist von einem in einem Korken eingelassenen etwa 1 cm dicken Glasstab durchbohrt; derselbe reicht bis nahe an den Mikroskopspiegel heran. Die Strahlen werden vom Reflektor des Schornsteins in das Ansatzrohr geworfen und gelangen mittels des Glasstabes durch totale Reflexion auf den Mikroskopspiegel.

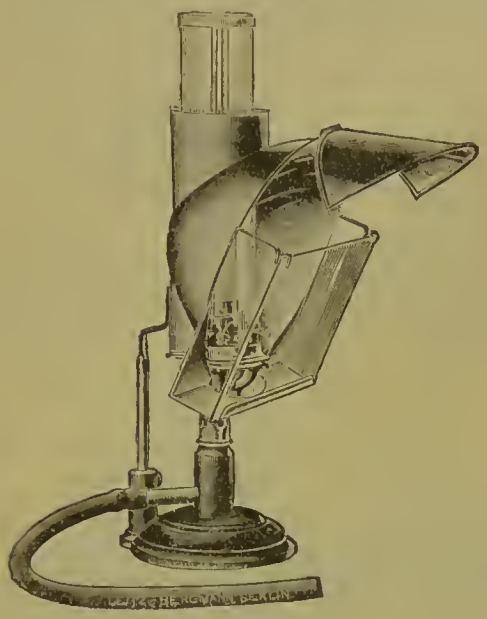


Fig. 17.

Mikroskopierlampe der Firma Leitz für Gasglühlicht (Fig. 17). Sie besitzt einen parabolischen Reflektor und einen Rahmen zum Einschieben einer blauen Glasscheibe.

Bei der Tröster'schen [59] Mikroskopierlampe wird das Licht durch ein gerades, innen poliertes Metallrohr direkt auf den Spiegel des Mikroskops geworfen.

Der elektrische Beleuchtungsapparat von Noeske [32] ist in Form eines Objekttisches konstruiert und läßt sich leicht an jedem Mikroskop anbringen. Ein kleiner Akkumulator dient als Beleuchtungsquelle.

Tames [58] beschreibt eine einfache Mikroskopierlampe, die im wesentlichen aus einer kleinen, runden elektrischen Glühlampe mit mattem Glas von 5 bzw. 10 Kerzen Leuchtkraft besteht. Dieselbe ist in einem gußeisernem Gestell möglichst nahe dem Spiegel des Mikroskops befestigt; zwischen beiden ist eine matte Glasscheibe, die nicht viel Licht absorbiert, eingeschaltet, außerdem zur Absorption der gelben Strahlen ein hellgefärbtes Kobaltglas.

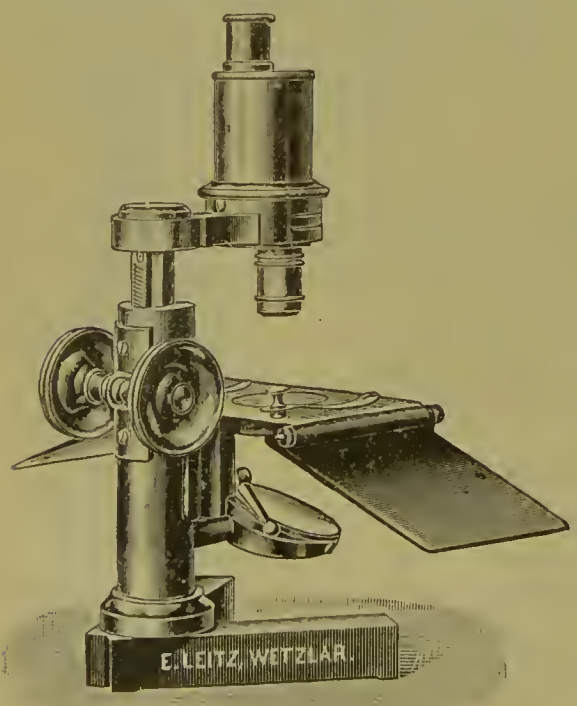


Fig. 18.

Das Lupenmikroskop.

Besonders für das „Fischen“ (s. u.) der Kolonien von der Platte ist die Benutzung ganz schwacher Vergrößerungen mit Hilfe des Lupenmikroskops zu empfehlen. Es besitzt zwei an den Seitenwänden des Objekttisches anzubringende Handauflagen.

Sehr bequem ist das Arbeiten mit dem von R. Pfeiffer [37] angegebenen bildaufrichtenden Präpariermikroskop

(Fig. 18). In dem Tubus befinden sich zwei gekreuzte Prismen, die durch ihre Wirkung das Betrachten bei aufrechtem Bild ermöglichen.

3. Die Dunkelfeldbeleuchtung.

Entwickelung und Prinzip: Die Leistungsfähigkeit der Mikroskope wird durch die Anwendung des Ultramikroskops mit Dunkelfeldbeleuchtung dahin erweitert, daß durch sie ein Objekt noch sichtbar gemacht wird, auch wenn sein Durchmesser weit unter $^1/_{10\,000}$ mm herabsinkt, und — was wesentlich ist — auch dann, wenn das Gebilde nicht „selbstleuchtend" ist. Schon im Jahre 1838 wurde von J. B. Reade auf eine neue Beleuchtungsmethode, die sogenannte Blackground Illumination hingewiesen. 1856 wurde von Wenham das Paraboloid und 1879 von Stephenson [57] eine konkave Kugelzone in Verbindung mit einer Ebene zur Dunkelfeldbeleuchtung benutzt. Durch Siedentopf und Zsigmondy [48–54] wurde

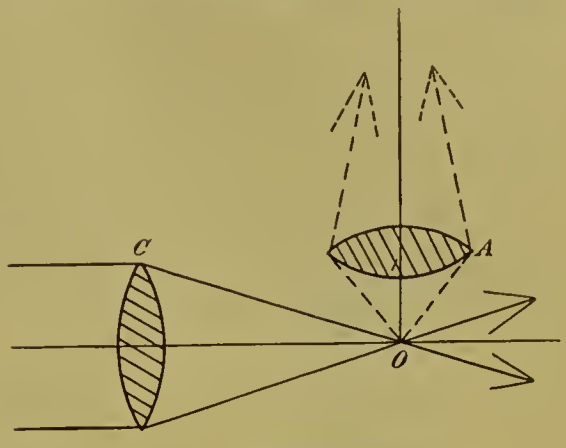


Fig. 19.

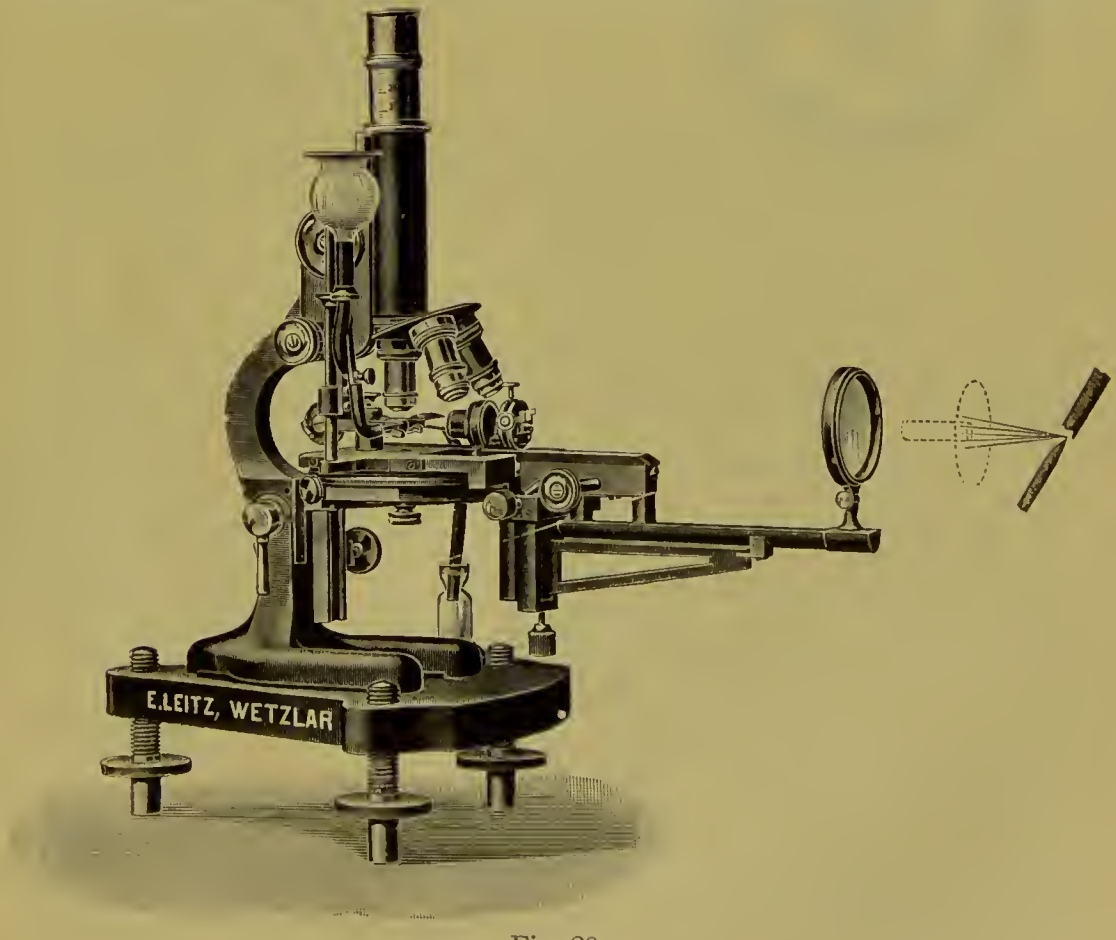


Fig. 20.

1903 eine Methode praktisch ausgearbeitet, ultramikroskopische Teilchen, d. h. solche unter 0,12 μ, sichtbar zu machen. Das Prinzip dieser Beleuchtung besteht darin, daß die Teilchen intensiv belichtet werden (Sonne, Bogenlampe). Das Licht wird durch ein Kondensorsystem auf das Objekt geworfen, die eingebetteten Teilchen werden durch die Aufsplitterung des Lichtes gleichsam selbstleuchtend. Ein Mikroskop vereinigt das rechtwinklig zum Strahlengang zerstreute Licht zu einem „Bild". Zur Sichtbarmachung der Teilchen wird demnach nicht das direkte Licht, sondern das abgebeugte benutzt, und die Teilchen wirken auf einem schwarzen Hintergrund selbstleuchtend (Fig. 19).

Von der Firma Leitz wird ein Apparat konstruiert, der sich an jedem Mikroskop anbringen läßt und in der eben beschriebenen Weise die Sichtbarmachung ultramikroskopischer Teilchen gestattet (Fig. 20).

Bei der neueren Dunkelfeldbeleuchtung geschieht die Abblendung dadurch, daß unter den Abbeschen Kondensor eine zentrale Scheibe eingelegt wird (Fig. 21). Die das Objekt treffenden Strahlen

Fig. 21.

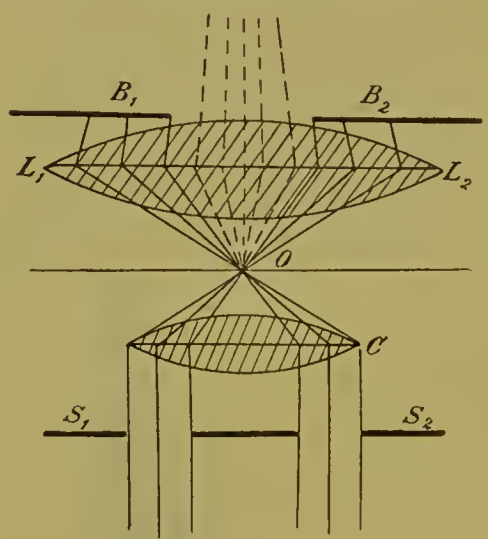


Fig. 22.

werden durch eine in das Objektiv eingelegte Blende ferngehalten, so daß nur im Objekt abgebeugte Strahlen in das Objektiv gelangen können (Fig. 22).

Der Spiegelkondensor nach Reichert[39–41] (Fig. 23) besteht aus einer Plankonvexlinse mit sphärischer Krümmung, der mittlere Teil der konvexen Fläche ist abgeschliffen. Durch eine Blende werden alle Strahlen, deren Apertur geringer als 1,05 ist, ausgeschaltet. Wie bei der einfachen Dunkelfeldbeleuchtung muß zwischen Kondensor und Objektträger Immersionsöl eingefügt werden, die Betrachtung geschieht dort wie hier mit Trockenobjektiven.

Soll mit Oelimmersion gearbeitet werden, so muß man alle Strahlen von einer Apertur über 1,05 durch eine in das Objektiv eingefügte Blende zurückhalten (Fig. 24 *b*).

Der von der Firma Zeiss nach den Angaben von Siedentopf[48–54] konstruierte Paraboloidkondensor, der sich nur durch die Krümmungsoberfläche von dem Reichertschen unterscheidet, besitzt diesem gegenüber den Vorzug besserer sphärischer Korrektion und damit auch größerer Lichtstärke (Fig. 25).

Durch die Zentralblende (*B*) werden Strahlen von der Apertur 0 bis 1,1 abgehalten, die übrigen gehen durch den Kondensor (*P*) hindurch und werden im Fokus des Paraboloids am oberen Rande des Objektträgers (*O*), sobald sich Luft darüber befindet, reflektiert. Die Betrachtung erfolgt gleichfalls mit Trockensystemen unter Herstellung einer Oelverbindung zwischen Objektträger und Kondensor.

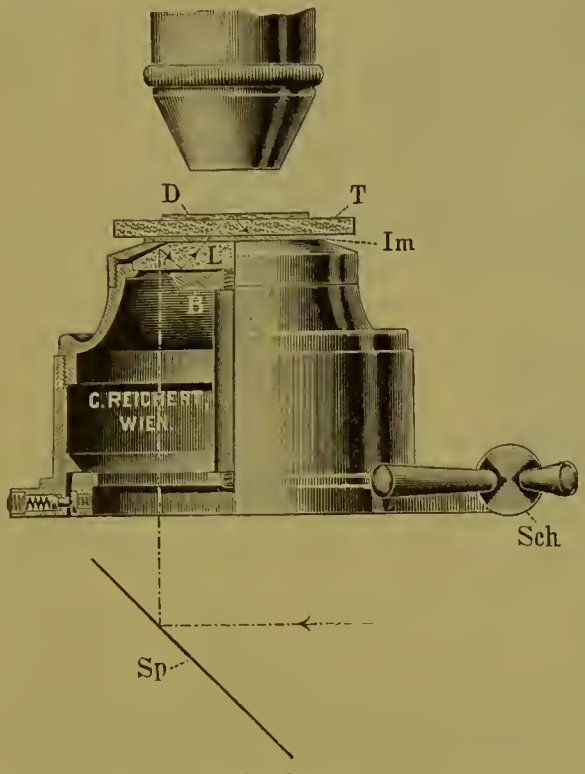


Fig. 23.

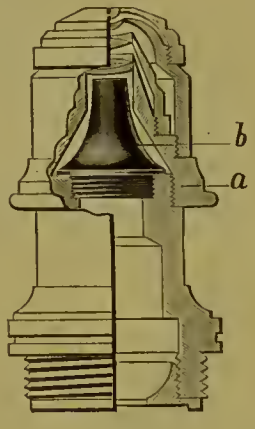


Fig. 24.

Bei Verwendung von Immersionssystemen in Verbindung mit dem Paraboloidkondensor kann natürlich ohne weiteres eine Total-

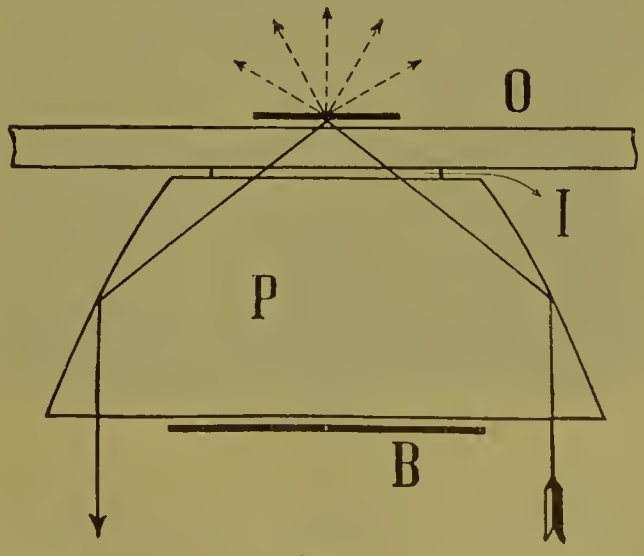
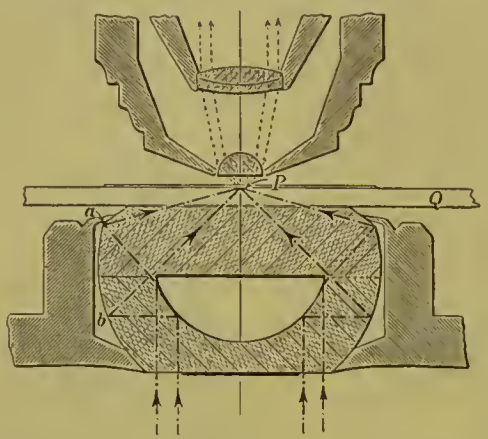


Fig. 25.

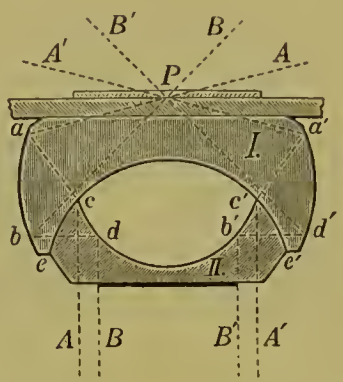
reflexion der beleuchtenden Strahlen an der Oberfläche des Deckglases nicht stattfinden, es muß auch hier die hohe Apertur des Objektives durch eine Einhängeblende unwirksam gemacht werden.

Zu gleicher Zeit wurde von der Firma Leitz nach den Angaben von v. Ignatowsky [21 u. 22] ein neuer Spiegelkondensor konstruiert, der durch die Anwendung zweier reflektierenden Flächen, einer inneren und einer äußeren, eine bessere Strahlenvereinigung und dadurch eine stärkere Beleuchtung des Objektes gestattete. Neuerdings ist die plane Trennungsfläche des Kondensors durch eine sphärische ersetzt worden (Fig 26 u. 26a).



1.

Fig. 26.



2.

Fig. 26a.

Fig. 27 zeigt eine photographische vergrößerte Aufnahme der aus dem Spiegelkondensor austretenden Strahlen.

Fig. 27.

Die Kondensoren von Reichert und Leitz werden in zwei Ausführungen hergestellt: die eine Art läßt sich an die Stelle des gewöhnlichen Kondensors einschieben, die andere wird auf dem Objekttisch befestigt. — Der Zeisssche Kondensor kann nur in der ersten Weise angebracht werden. — Der Plattenspiegelkondensor von Leitz läßt sich zwecks einer Korrektion der Objektträgerdicke durch einen Hebel in der Achse des Mikroskops verschieben (Fig. 28).

Bedingung für das Zustandekommen eines guten Dunkelfeldes ist das Vorhandensein einer genügend starken Lichtquelle. Von der

Fig. 28.

Firma Zeiss wird für diese Zwecke eine Nernstlampe empfohlen, deren Leuchtkraft bis zu 1000 Kerzen beträgt (Fig. 29).

Sehr gutes Licht liefert auch die von Leitz hergestellte Liliputbogenlampe (Fig. 30), die an jede vorhandene Lichtleitung unter Einschaltung eines Widerstandes angeschlossen werden kann. Zwischen

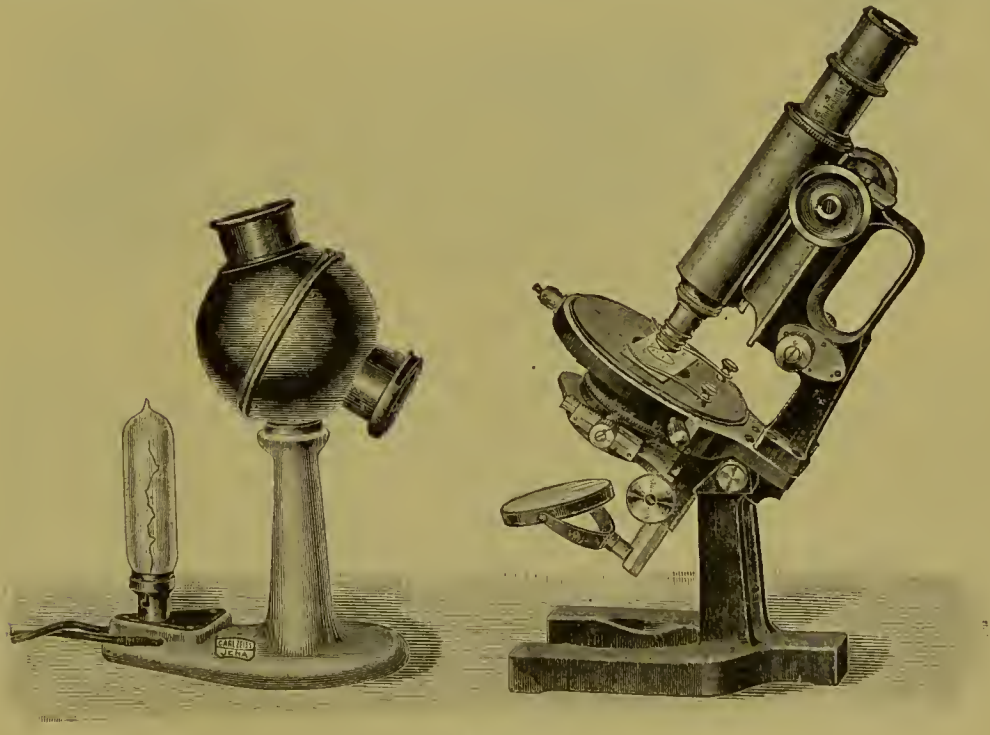


Fig. 29.

Lampe und Mikroskop wird zur Dämpfung des Lichtes eine Mattscheibe aufgestellt. — Ist nur eine Gasleitung vorhanden, so genügt auch hängendes Gasglühlicht unter Benutzung einer Schusterkugel als Sammellinse. — Bei dieser Anordnung wird unangenehme Wärmewirkung vermieden und der Planspiegel gleichmäßig mit Licht gefüllt.

Die Anwendungsweise des Dunkelfeldkondensors ergibt sich im Prinzip aus der nachstehenden Beschreibung, die speziell für den Kondensor von Leitz gilt.

Der Kondensor wird auf den Tisch des Mikroskopes gelegt und mit den Klemmen so festgehalten, daß der auf der Abbildung (Fig. 28) sichtbare Hebel an die Säule, also auf die Seite des Beobachters zu liegen kommt. — Mit Hilfe einer Beleuchtungslinse wird das Licht auf den Planspiegel konzentriert. Beim Gebrauch der Bogenlampe von 4 Ampère wird die Lampe, in deren Gehäuse sich die Beleuchtungslinse befindet, in einer solchen Entfernung vom Mikroskop aufgestellt, daß der vor dem Mikroskop sitzende Beobachter ihre Regulier-vorrichtung bequem mit der Hand erreichen kann. Benützt man eine Nernstlampe oder Gasglühlichtlampe, so muß eine besondere Linse auf Stativ verwandt werden. — Man stellt die Lampe in eine solche Entfernung von der Linse, daß das aus ihr austretende Strahlenbüschel parallel wird.

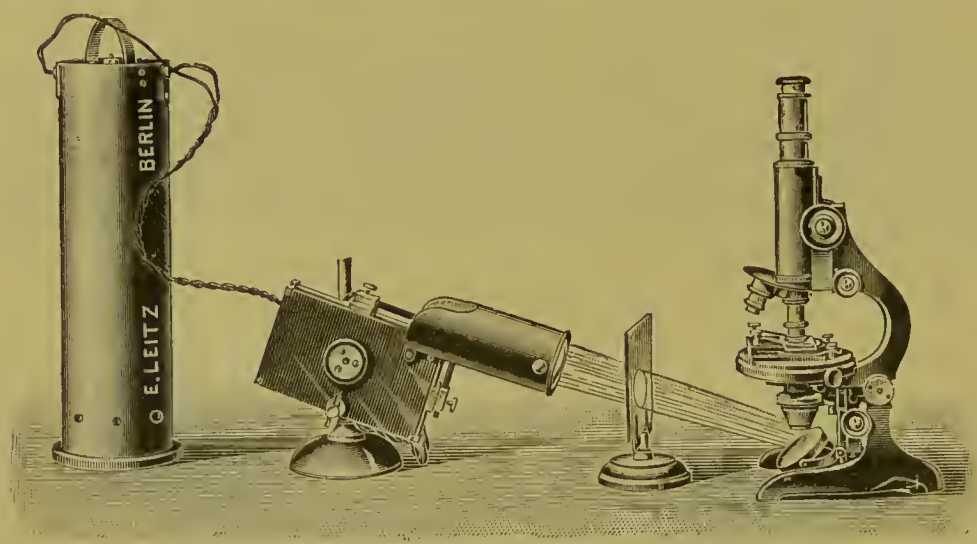


Fig. 30.

Um ein gutes Dunkelfeld zu erhalten, muß man den Kondensor auf das genaueste zentrieren. Zur Erleichterung der Zentrierung sind auf der oberen Fläche des Spiegelkondensors zwei kleine konzentrische Kreise eingeritzt. Diese bringt man mit Hilfe eines schwachen Objektives in die Mitte des Gesichtsfeldes, wodurch die Achse des Kondensors mit der Achse des Mikroskopes ungefähr zum Zusammentreffen gebracht und die anfängliche grobe Zentrierung erreicht wird. Die feinere Zentrierung geschieht dann mit Hilfe von stärkeren Objektiven. Auf die eingestellte Stelle des Kondensors bringt man nun einen Tropfen Cedernöl und legt den Objektträger (mit Deckglas versehen) auf.

Durch Heben und Senken der Dunkelfeldbeleuchtung mittels des schon erwähnten Hebels korrigiert man die Dicke der Objektträger und sucht unter Verwendung der Korrektionsfassung des Objektives ein Dunkelfeld zu bekommen, das auf möglichst dunklem Hintergrund die Bakterien hell leuchtend zeigt.

Es ist bei der Beobachtung mit der Dunkelfeldeinrichtung sehr darauf zu achten, daß der Objektträger, sowie das Deckglas möglichst sorgfältig gereinigt sind, damit Staubteilchen nicht störend bei der Beobachtung wirken können. Das Präparat selbst muß möglichst dünn sein, d. h. aus möglichst wenig Material hergestellt.

Im anderen Falle würden die Teilchen, die außerhalb der Einstellebene liegen, störende Reflexe hervorrufen. Außerdem müssen eventuell in der Oelschicht befindliche Luftblasen entfernt werden.

Literatur zum I. Kapitel.

1. Abbe, E., Gesammelte Abhandlungen, Bd. 1: Abhandlungen über die Theorie des Mikroskopes, Jena 1904.
2. — Sitz.-Ber. d. Med.-Naturw. Gesellsch. zu Jena, 10. Jan. 1879.
3. Abel, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. 12, 1894.
4. Beer, A., Der Wert der Dunkelfeldbeleuchtung für die klinische Diagnose der Syphilis. Münch. med. Wochenschr., Nr. 39, 1907.
5. Best, Das Hornhautmikroskop nach Zeiss. Ges. f. Natur- u. Heilk. in Dresden, 9. Febr. 1907.
6. Czapski, S., Theorie der optischen Instrumente nach Abbe. Breslau 1893.
7. Dietrich, Demonstration des Paraboloidkondensors von Siedentopf. Berl. med. Gesellsch., 15. Juli 1908.
8. Dippel, L., Das Mikroskop und seine Anwendung. 1. Teil: Handb. d. allg. Mikr. Braunschweig 1898.
9. Friedrich, Mitteil. a. d. Kais. Gesundh.-Amt. Bd. 8.
10. Gaidukov, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1906.
11. — Verh. d. Deutsch. Zool. Ges., 1906.
12. Garten, Leitfaden der Mikroskopie, Leipzig 1904.
13. Gleichen, Einführung in die med. Optik. Leipzig, W. Engelmann.
14. Hager-Mez, Das Mikroskop und seine Anwendung. Berlin, J. Springer.
15. Heimstädt, O., Apparat zur Dunkelfeldbeleuchtung und für Ultramikroskopie. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 50, H. 2, 1909.
16. v. Hübl, Theorie und Praxis der Farbenphotographie mit Autochromplatten. Enzyklopädie der Photographie, H. 60. Halle, W. Knapp.
17. Hübner, Demonstration des Leitzschen Dunkelfeldkondensors. Wiss. Verein. am städt. Krankenh. Frankfurt a. M., 7. Jan. 1908.
18. Jentzsch, Felix, Ueber Dunkelfeldbeleuchtung. Verh. d. Deutsch. Physik. Ges., 12. Jahrg. Nr. 22.
19. — Ein elektrischer Heizapparat für mikroskopische Untersuchungen. Zeitschr. f. wissensch. Mikr. u. mikr. Technik, Bd. 27, 1910.
20. — Der Ultrakondensor. Verh. d. Deutsch. Phys. Ges., 12. Jahrg., Nr. 22.
21. v. Ignatowsky, Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie, Bd. 25, 1908.
22. — ebd., Bd. 26. 1909.
23. Kaiser, W., Die Technik des modernen Mikroskopes. Wien 1901.
24. Koch, R., Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, 1877.
25. — Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfektionskrankh. Leipzig 1878.
26. König, Die Autochromphotographie. Photogr. Bibliothek, Bd. 23.
27. Kraus, R., Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 32, Nr. 6, 1902.
28. Kraus, R., Centralbl. f. Bakt., Bd. 23, 1898.
29. Leitz, Wetzlar, Das Mikroskop und seine Anwendung.
30. Löwenstein, Dreifarbenmikrophotographie. Zeitschr. f. Tub., Bd. 10, H. 1.
31. Neuhaus, R., Lehrbuch der Mikrophotographie. Leipzig, S. Hirzel.
32. Noesske, Elektrischer Beleuchtungsapparat für das Mikroskop. Physiol. Verein zu Kiel, 22. Febr. 1909.
33. Nuttall, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 27, 1900.
34. Petri, R. J., Das Mikroskop. Berlin 1896.
35. Pfeiffer, L., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 2, 1887.
36. — Die Protozoen als Krankheitserreger, 1890.
37. Pfeiffer, R., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 27, 1900.
38. Plehn, F., Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. 8, 1890.
39. Reichert, C., Ueber einen Spiegelkondensor zur Sichtbarmachung ultramikroskopischer Teilchen. 78. Vers. deutsch. Naturf. u. Aerzte, Stuttgart 1906.
40. — Ein neuer Spiegelkondensor (Plattenkondensor). 79. Vers. d. Naturf. u. Aerzte, 1907.
41. — Ueber die Sichtbarmachung der Geißeln und die Geißelbewegung der Bakterien. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 51, H. 1, 1909.
42. Sachs-Müke, Einfacher Apparat zum Wiederauffinden bestimmter Stellen im mikroskopischen Präparat. Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 26.
43. Scheffer, W., Ueber mikrokinematographische Aufnahmen. Berlin. klin. Wochenschr., 1910, Nr. 12.

44. Scheffer, W., Wirkungsweise und Gebrauch des Mikroskopes und seiner Hilfsapparate. B. G. Teubner, Leipzig, 1911.
45. Schimenz, P., Die neuen Zeichenokulare von Leitz. Zeitschr. f. wissensch. Mikr., Bd. 12, 1895.
46. Schultze, M., Arch. f. mikr. Anat., Bd. 1, 1865; Bd. 9, 1873.
47. Schumberg, Methode zur schnellen Herstellung von Projektionsbildern. Deutsche Med., 1906, Nr. 3.
48 Siedentopf, Ueber die phys. Prinzipien der Sichtbarmachung ultramikroskopischer Teilchen. Berl. klin. Wochenschr., 1904, Nr. 32.
49. — Ultramikroskopische Literatur in Zeitschr. f. Chemie u. Industrie d. Kolloide, Bd. 1, H. 6 u. 9, 1907.
49. — Dunkelfeldbeleuchtung und Ultramikroskopie. Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. m. Technik, Bd. 24, 1907.
51. — Paraboloidkondensor. Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. m. Technik, Bd. 24, 1907.
52. — Paraboloidkondensor von Zeiss. Naturwiss.-Med. Ges., Jena, 20. Juni 1907. — Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 30.
53. — Die Vorgeschichte der Spiegelkondensoren. Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. m Technik, Bd. 24, 1908.
54. — & Zsigmondy, Annalen der Physik, Bd. 10, 1903.
55. Sievers, Untersuchungen über die Lumièrsche Dreifarbenphotographie. Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 19.
56. Stein, Centralbl. f. wissensch. Mikr., 1884.
57. Stephenson, Journal of the Microsc. Soc., 1878.
58. Tames, T., Zeitschr. f. wissensch. Mikr., Bd. 18, S. 280.
59. Tröster, Eine neue Mikroskopierlampe. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 45, H. 6.
60. Zimmermann, A., Das Mikroskop. Leipzig und Wien 1895.
61. Zwintz & Thien, Ueber einen neuen elektrisch heizbaren Objekttisch für Mikroskope. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 42, H. 2, 1906.

II. Kapitel.

Das mikroskopische Präparat.

a) Das ungefärbte Präparat.

1. Der hängende Tropfen.

Die Bakterien werden mit Hilfe des Mikroskopes im lebenden und toten Zustande untersucht. Die Untersuchung im lebenden Zustande erfolgt am besten mittels des hohl geschliffenen Objektträgers im hängenden Tropfen (Fig. 31). Er wird folgendermaßen angelegt:

Fig. 31.

Auf die Mitte eines reinen Deckglases wird ein Tropfen der auf Bakterien zu untersuchenden Flüssigkeit mit einer ausgeglühten sterilen Platinöse gebracht. Soll festes Material untersucht werden, so wird eine Spur davon in einem auf das Deckglas aufgetupften Tropfen Bouillon, Peptonwasser, Agarkondenswasser oder Leitungswasser verrieben. Destilliertes Wasser eignet sich in der Regel wegen seines relativ hohen Keimgehaltes nicht. Das beschickte Deckglas wird mit einer Pinzette gefaßt und umgekehrt auf den mit

einem luftabschließenden Mittel, z. B. gelbe Vaseline, umzogenen Ausschliff eines hohlgeschliffenen Objektträgers aufgelegt und vorsichtig angedrückt.

Man kann auch, statt vorher den Wall des Objektträgers mit Vaseline zu umkleiden, nach dem Auflegen des Deckglases den Abschluß der Kammer vollziehen, indem man die Kanten des Deckglases ringsum mit verflüssigtem Wachs überzieht. Am einfachsten ist es, zu diesem Zweck mit dem Docht einer kleinen brennenden Wachskerze die Deckglasränder zu umstreichen. Dabei bleiben genügende Mengen geschmolzenen Wachses haften. Der Abschluß der Kammer durch das Deckglas muß überall dicht sein, da sonst der Tropfen schnell eintrocknet. Der hängende Tropfen gestattet die Beobachtung der morphologischen Verhältnisse der Bakterien, ihrer Zusammenlagerung, ihrer Struktur auf Grund der verschiedenen Lichtbrechungsfähigkeit der einzelnen Teile der Leibessubstanz gegenüber der Einschlußmasse, vor allem aber der Beweglichkeit.

Man hüte sich davor, zu viel Material in den hängenden Tropfen hineinzuimpfen, da ein zu großer Reichtum des Hängetropfens an Bakterien die genaue Beobachtung der Einzelindividuen und das Studium der Bewegungsfähigkeit stört. Auch sollen Bakterien, die bei Körpertemperatur wachsen, nicht in zu kaltem Wasser suspendiert werden, da in diesem Falle Kältestarre Bewegungslosigkeit einer an sich beweglichen Art vortäuschen kann.

Zur Untersuchung des hängenden Tropfens benutzt man enge Blendung, da es sich um ein ungefärbtes Präparat handelt und also nach dem Vorhergesagten ein Strukturbild erzeugt werden soll. Zunächst stellt man mit Hilfe der schwachen Vergrößerung den Rand des hängenden Tropfens ein. Da im Innern der völlig abgeschlossenen Kammer die Luft infolge Verdunstung der Suspensionsflüssigkeit mit Feuchtigkeit gesättigt ist, so schlagen sich bei geringer Abkühlung an der Innenseite des Deckglases rings um den Hängetropfen kleine Tautröpfchen nieder, die die Einstellung erleichtern. Sie befinden sich im Gesichtsfeld auf der einen Seite des sich scharf abhebenden Randes, auf dessen anderer Seite ein Teil des Hängetropfens sichtbar ist. Den eingestellten Rand schiebt man genau in die Mitte des Gesichtsfeldes. Alsdann hebt man den Tubus des Mikroskops mit dem groben Trieb, bringt das Immersionsöl auf das Deckglas und vertauscht das schwächere Objektiv mit der Immersionslinse. Nachdem die Blende bis zur Hälfte geöffnet ist, schraubt man die Immersionslinse so weit herunter, daß sie gerade in den Oeltropfen eintaucht. Unter Kontrolle des Mikroskops stellt man nun den Rand des hängenden Tropfens mit der Immersionslinse ein. Ein geringes Hin- und Herschieben des Objektträgers erleichtert dabei die Einstellung, da auf diese Weise der Rand leichter sichtbar wird und ein Eindrücken des Deckglases durch zu tiefes Herabschrauben der Immersionslinse vermieden wird. Schließlich kann man zur bequemeren Einstellung den Tropfen mit einer Spur Fuchsin oder Neutralrot färben, was die Bakterien nicht wesentlich schädigt.

Da bei guten Mikroskopen die Objektive gleich zentriert sind, so steht bei der starken Vergrößerung der Rand des Tropfens wiederum in der Mitte des Gesichtsfeldes.

Die Betrachtung des Randes ist am bequemsten, weil dort der Tropfen am dünnsten und damit das Bild am schärfsten ist. Ferner

sammeln sich infolge des hier regeren Gasaustauschs die beweglichen Bakterien gerade am Rande des Tropfens an; andererseits ist hier durch die dünne Flüssigkeitsschicht ihre Beweglichkeit etwas beschränkt, so daß man die morphologischen Verhältnisse am Rande bequemer studieren kann als in der Mitte, wo bewegliche Formen viel schneller dem Gesichtsfeld entschwinden.

An die Betrachtung des Randes schließt sich die Betrachtung der mittleren Partien des hängenden Tropfens an. Dabei hat man darauf zu achten, daß unbewegliche Arten leicht zu Boden sinken, und man muß deshalb die ganze Dicke des hängenden Tropfens mit der Linse durchdringen. Dies ist jedoch beim Immersionssystem in Anbetracht des geringen Abstandes zwischen Linse und Objekt nur dann möglich, wenn der Tropfen flach ist. Darauf ist beim Anlegen des Tropfens Rücksicht zu nehmen.

Arbeitet man bei dem Anlegen eines hängenden Tropfens streng aseptisch und verwendet man dabei flüssiges oder verflüssigtes Nährsubstrat, so läßt sich, besonders unter Zuhilfenahme eines heizbaren Objekttisches, die Entwicklung der Bakterien unter dem Mikroskop gut beobachten.

Will man ein bestimmtes Entwicklungsstadium der Bakterien festhalten, so hebt man vorsichtig das Deckglas hoch, setzt eine Spur Formalin oder 2-proz. Osmiumsäure zum Untersuchungstropfen, legt das Deckglas wieder auf und sorgt für einen guten Luftabschluß.

Ist die Untersuchung beendet, so dreht man das Deckglas so über den Einschliff, daß eine Ecke über den Rand des Objektträgers hervorragt. An dieser wird es vom Objektträger abgehoben und in eine desinfizierende Flüssigkeit gebracht. Dabei soll der keimhaltige Tropfen an keiner Stelle mit dem Objektträger in Berührung kommen. Letzterer ist dann ohne weiteres zu anderen Untersuchungen zu benutzen. Soll der hängende Tropfen als Dauerpräparat gefärbt werden, so befreit man das Deckglas mit Xylol von dem anhaftenden Cedernöl und der Vaseline, läßt es lufttrocken werden und behandelt es in der später zu beschreibenden Weise.

Für das Studium der Morphologie der Bakterien ist die Untersuchung des hängenden Tropfens nur von beschränktem Werte. Einzelheiten lassen sich namentlich bei sehr beweglichen Bakterien nur schwer oder gar nicht erkennen, es sei denn, daß man durch Zusatz einer Spur eines Narcoticums die Keime immobilisiert. Vor allen Dingen aber liefert diese Methode keine Präparate, die unbeschränkt haltbar sind. Man kann zwar derartige Präparate, wenn der Abschluß ein sorgfältiger ist, mehrere Tage lang aufbewahren und die Entwicklung der Bakterien studieren, aber schließlich verdunstet der Tropfen doch.

2. Das Burrische Tuscheverfahren[47].

Handelt es sich um das schnelle Sichtbarmachen von Mikroorganismen, ohne daß dabei die Bakterien fixiert und gefärbt werden sollen, so empfiehlt sich das von Burri in erster Linie für die Herstellung von Einzellenkulturen angegebene und ausgearbeitete Verfahren (näheres Kapitel III). In der Regel geschieht die Herstellung eines mikroskopischen Tuschepräparates in der folgenden Weise:

Pelikantusche 541 (zu beziehen durch Dr. G. Grübler & Co., Leipzig, hergestellt von der Firma Günther Wagner, Hannover und Wien) wird mit 9 Teilen Aqua dest. verdünnt, in gutgereinigte sterile Reagenzgläser gefüllt und unter Watteverschluß im Autoklaven eine halbe Stunde bei einer halben Atmosphäre sterilisiert. Vor dem Gebrauch läßt man die so vorbereitete Tuschesuspension gut verschlossen mindestens 2 Wochen stehen und verwendet dann nur die oberen Schichten.

Eine Oese des Untersuchungsmaterials wird mit einer Oese der Tusche auf einem Objektträger verrieben und mit Hilfe eines Deckgläschens in dünner Schicht ausgestrichen. Ist das Präparat lufttrocken geworden, so kann sich unmittelbar die Untersuchung mit Oelimmersion anschließen: Auf dunklem Grunde erscheinen die durchsichtigen Mikroorganismen und andere korpuskuläre Elemente als helle Gebilde, da diese die Lichtstrahlen hindurchfallen lassen, während die sie umgebenden Tuscheteilchen das Licht zurückhalten.

Hecht & Wilenko[111], die an luetischen Leichenmaterial arbeiteten, verdünnten dasselbe vor dem Verreiben mit einigen Tropfen Wasser und fügten dann erst die Tuschesuspension hinzu.

Frühwald[78], der das Verfahren zum Spirochätennachweis am Lebenden benutzte, fertigt erst gewöhnliche Ausstrichpräparate an, läßt sie trocknen und streicht dann die Tusche darüber aus.

Gins[94] verdünnt die Tusche nicht 1:10, sondern nur 1:1, und benutzt zum Verteilen einen dem Wrightschen „Spreader" nachgebildeten Ausstreicher.

Obgleich die meisten Autoren das rein mikroskopische Tuscheverfahren — namentlich zum raschen Spirochätennachweis — warm empfehlen, glauben doch einige Forscher vor einer Ueberschätzung der Methode warnen zu müssen, so u. a. Plaut[224 u. 225], Posner[227], Mulzer[196].

Vorteile des Tuschepräparates sind seine schnelle und leichte Herstellungsweise, seine Haltbarkeit, die Unabhängigkeit von dem mehr oder weniger ausgesprochenen Farbenaufspeicherungsvermögen des Mikroorganismus.

b) Das gefärbte Dauerpräparat.

Seitdem Koch (1877) gezeigt hat, daß Bakterien, in dünner Schicht auf Deckgläser ausgebreitet, ihre Form wahren und durch Behandlung mit Anilinfarben sich sichtbar machen lassen, benutzt man zum Nachweis der Bakterien und zum Studium ihrer Morphologie neben dem hängenden Tropfen diese gefärbten Dauerpräparate. Da die Färbung in gewissem Sinne ein chemischer Prozeß ist, so gibt sie uns auch die Handhabe zur Differenzierung morphologisch gleichartiger, aber in ihrem chemischen und physikalischen Verhalten differenter Bakterienaretn.

Methoden der Anreicherung zum mikroskopischen Nachweis der Bakterien.

Sind auf einfache Weise Bakterien im Untersuchungsmaterial nicht nachzuweisn, besteht aber doch der Verdacht einer spezifischen Infektion, so muß man versuchen, die eventuell nur sehr spärlich

vorhandenen Bakterien für den mikroskopischen Nachweis anzureichern.

Ruge[242] hat speziell für Erleichterung der Meningokokkendiagnose eine sehr einfache Methode angegeben: Auf sterilen Objektträger bringt man 6—8 Tropfen der zu untersuchenden Lumbalflüssigkeit, bedeckt den Objektträger mit einer Petrischale und läßt bei Zimmertemperatur allmählich eintrocknen. Ehe die Eintrocknung vollendet ist (nach 10—12 Stunden), ist eine deutliche Vermehrung der Keime erfolgt, so daß der mikroskopische Nachweis in den meisten Fällen gelingt.

Die größten Schwierigkeiten hat von jeher das Auffinden nur spärlich vorhandener Tuberkelbacillen im Auswurf gemacht, ganz besonders dann, wenn es sich um sehr zähe Sputa handelt. — Lassen sich in verdächtigem Auswurf keine Tuberkelbacillen auffinden, so hat die Wiederholung der Untersuchung unter Zuhilfenahme eines der folgenden Verfahren zu erfolgen:

Nebel[119] versetzt das Sputum in einem weithalsigen, mit Gummistopfen verschlossenen Gefäße mit der 8—10-fachen Menge klaren Kalkwassers und schüttelt kräftig. Nach vollständiger Homogenesierung wird das Sputum etwa 2 Minuten lang zentrifugiert. Die über dem Sedimente stehende Flüssigkeit wird in einen keimdichten Berkefeldfilter von etwa 15 ccm Inhalt gegeben und langsam filtriert. Der Rückstand wird in der üblichen Weise untersucht.

Nach Biedert[31] werden 15 ccm gut verrührten Sputums mit 30 ccm Wasser kalt vermischt und je nach der Dicke mit 4—8 Tropfen NaOH versetzt. Dann wird die Mischung unter Umständen gekocht, wobei 60—90 ccm Wasser zugefügt werden, bis das ganze homogen ist. Nach 2 Tagen wird das Sediment, das man in einem Spitzglase sich hat absetzen lassen, in der üblichen Weise untersucht.

H. Hammerl[106] fügte zum Sputum zwecks Homogenisierung das 5-fache seines Volumens gewöhnlichen Ammoniak, dem Kalilauge bis zu einer Konzentration von 1 Proz. hinzugesetzt war. Nachdem die Mischung einige Minuten kräftig geschüttelt, wird zu je 15 ccm unter Schütteln 5 ccm Aceton hinzugefügt. — Das nach $^1/_2$-stündigem Zentrifugieren gewonnene Sediment wird in der üblichen Weise untersucht.

Nakao Abe[2] fügte zu 5—10 ccm Sputum 15—30 ccm folgender Lösung:

2,0 Sublimat
10,0 Kochsalz
8,0 Wasser,

schüttelte 10 Minuten und zentrifugierte je 15 ccm 10 Minuten. Sehr bakterienarme Sputa werden durch Berkefeldfilter filtriert, Zentrifugat resp. Filterrückstand auf Objektträger gefärbt. —

Sachs-Müke[248–249] setzt Wasserstoffsuperoxyd (auch zu gleichen Teilen mit Sublimat gemischt) zu frischem Sputum. Durch den sich unter Aufbrausen entwickelnden Wasser- und Sauerstoff werden die Zellen zerrissen, die zähesten Ballen aufgelöst und die Tuberkelbacillen freigemacht, so daß sie sich dann beim Zentrifugieren im Sediment leichter auffinden lassen. Die Methode ermöglicht die Untersuchung der Gesamttagesmenge des Auswurfes. Sachs-Müke zieht die Wasserstoffsuperoxydmethode, die übrigens in ähnlicher

Form schon 1903 von Sorgo beschrieben worden ist, dem Antiforminverfahren (s. u.) vor, namentlich wenn es sich um nur nach Gram färbbares Virus, das durch das 50-proz. Antiformin eventuell geschädigt werden kann, handelt. Zur Untersuchung bringt Sachs-Müke etwa $^1/_2$ ccm Sediment auf einen Objektträger und verstreicht das Material mit der Pipette oder zieht es an einem zweiten Objektträger ab, läßt diese Menge lufttrocken werden und bringt wieder $^1/_2$ ccm Sediment dazu, läßt wieder lufttrocken werden und wiederholt dieses Verfahren nach Bedarf mehrmals. — Peters[219] empfiehlt zur Vermeidung der störenden Schaumbildung langsamen Zusatz des Wasserstoffsuperoxydes und wiederholtes Umrühren mit einem Glasstab. — Ellermann & Erlandsen[66 u. 67] versetzen 10—15 ccm Sputum mit $^1/_2$ Volumen 0,6-proz. Natriumkarbonat und überlassen die Mischung 24 Stunden bei 37° der Autodigestion. Das Flüssige wird abgegossen und das Sediment zentrifugiert. Ein Volumen Bodensatz wird mit 4 Volumen 0,25-proz. Natronlauge verrührt, aufgekocht und noch einmal zentrifugiert. — Ellermann & Erlandsen haben die Methode auch zum Nachweis von Tuberkelbacillen im Harn herangezogen: Der durch Katheter entleerte Harn kommt in ein Uringlas oder in ein hohes Zylinderglas. Nach einiger Zeit wird der obenstehende Harn vom Niederschlag abgegossen. 10—15 ccm dieses Niederschlages werden in eingeteilte Zentrifugengläschen gebracht und sorgfältig zentrifugiert, vorher werden eventuell vorhandene Urate durch vorsichtiges Erwärmen entfernt. Nach dem Zentrifugieren wird der obenstehende Harn abgegossen. Das Volumen des Niederschlages wird abgelesen, mit 4 Volumen 0,25-proz. Natriumkarbonat gemischt und 24 Stunden im Brutofen (37° C) in dem Zentrifugengläschen stehen gelassen. (Wenn man Pankreatinverdauung vorzieht, muß man 25—50 cg Pankreatin und einige Tropfen Thymolspiritus zusetzen.) Falls die Reaktion der Flüssigkeit noch deutlich sauer ist, kann noch einmal Natriumkarbonatzusatz und Fortsetzen der Digestion durch einige Stunden notwendig werden. Die obere Schicht der Flüssigkeit wird abgegossen und der Rest sorgfältig zentrifugiert. Der Niederschlag wird endlich nach vollständigem Abgießen der obenstehenden Flüssigkeit mit 4 Volumen 0,25-proz. Natronlauge gemischt, bis alle Flocken verteilt sind, mit einem Glasstäbchen umgerührt und im Wasserbad bis zum Kochen erwärmt. Nach Abkühlen wieder sorgfältiges Zentrifugieren. Das Sediment wird dann zu Ausstrichpräparaten benutzt.

Die Nachprüfung der Ellermann-Erlandsenschen Methode durch H. Kögel[146], G. Jörgensen[134] und E. Herzfeld[121] haben durchweg sehr günstige Resultate ergeben.

Zum Nachweis der Tuberkelbacillen bei tuberkulöser Meningitis verfährt Manicatide[179] in der folgenden Weise: Er füllt eine Reihe von sterilen Reagenzgläsern mit Rückenmarkflüssigkeit; nach 10 bis 24 Stunden erhält man in den Gläsern ein leichtes, spinnengewebeartiges Gerinnsel. Dieses wird vorsichtig mit einer sterilen Platinnadel herausgenommen, auf einen Objektträger ausgebreitet, in feine Fibrillen auseinandergelöst, dann fixiert und nach den gewöhnlichen Methoden gefärbt.

Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Blut nimmt Rosenberger 5 ccm Blut aus der Armvene, fängt es sofort in 5 ccm 2-proz. Natrium-

citratlösung, die mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt ist, auf, schüttelt und läßt 24 Stunden kalt stehen. Von dem Sediment werden dicke Ausstriche angefertigt, die man bei mäßiger Wärme trocknen läßt.

Antiforminmethode: P. Uhlenhuth, Kersten und Xylander[286–291] machten im Jahre 1908 Mitteilung über ein Verfahren, das neben einer leichten Homogenisierung des Sputums den Vorteil hatte, alle nichtsäurefesten Begleitbakterien auszuschalten. — Es geschieht dies durch das Antiformin, eine Mischung von Eau de Javelle und Natronlauge, die die Eigenschaft hat, Schleim, Kot, Sputum, Keratin, Chitinsubstanzen zur Auflösung zu bringen. Auch Bakterien und Protozoen halten mit Ausnahme säurefester Bakterien dem Mittel nicht stand, es eignet sich daher das Verfahren außer zur Anreicherung der Tuberkelbacillen zum Zwecke des mikroskopischen Nachweises auch zur direkten Züchtung des Tuberkelbacillus aus dem Sputum (siehe Kapitel III).

20—30 ccm Sputum werden mit 55—65 ccm Aqua dest. plus 15 ccm Antiformin gemischt. Nach 1—2 Stunden ist eine Homogenisierung eingetreten, die man durch Umrühren mit einem Glasstabe und durch leichtes Erwärmen im Brutschrank oder Wasserbad noch beschleunigen kann. — Die homogenisierte Masse wird in einer rasch laufenden Zentrifuge scharf zentrifugiert und das Sediment nach einmaligem Waschen in Kochsalzlösung auf dem Objektträger ausgestrichen. — Die Ausstriche trocknet man am besten mit einer dünnen Schicht Eiweiß oder unbehandelten Sputums auf dem Objektträger oder Deckglas an.

Die Stärke der Konzentration des Antiformins richtet sich im allgemeinen nach der Zähigkeit des zu untersuchenden Sputums: bei dünnflüssigem genügt in der Regel eine 10-proz. Lösung, während man bei dickem zähen Sputum bis zu 25 Proz. hinaufgehen muß.

Thilenius[283] arbeitet mit 20—50-proz. Lösungen und setzt zur besseren Sedimentierung vor dem Zentrifugieren Alkohol hinzu.

H. Görres[97] gebraucht 25-proz., Gatti[93] sogar bis 70-proz. Lösungen, Lagrèze[158] schlug, da die Antiforminsedimente infolge ihres Alkaligehaltes sehr schwer auf dem Objektträger haften, vor, den Ausstrich ca. 3 Minuten in einer 2—3-promill. Sublimatlösung zu fixieren.

Hühne[129 u. 130] mischt den Bodensatz mit 2—3 Tropfen Eisessig und schüttelt um, solange Blasenbildung besteht, es erfolgt weiterer Zusatz von 2—3-facher Menge Aqua dest. und gleicher Menge Aether, Schütteln und Abzentrifugieren. — Seemann[265] benutzt zur besseren Haltung des Ausstriches 1 Teil geschlagenes Hühnereiweiß auf 10 Teile Aqua dest. mit 1 Proz. Formaldehyd. Von Hutzella[131] wurde eine Kombination des Antiforminverfahrens mit dem Tierversuch vorgeschlagen.

Klose[142] verfuhr zum Nachweis von Tuberkelbacillen im Stuhl folgendermaßen:

Zu 20—25 ccm einer 50-proz. Antiforminlösung bringt man ein erbsengroßes Kotstück und läßt diese Mischung 24 Stunden unter mehrfachem Aufschütteln bei Zimmertemperatur stehen, Zentrifugieren und zweimaliges Waschen des Bodensatzes mit physiologischer Kochsalzlösung, Anfertigen von Ausstrichen.

Hoffmann[126 u. 127] wies in zerquetschten linsen- und erbsengroßen Gewebsstücken, die er an den Objektträger antrocknete und mit Antiformin nachbehandelte, Tuberkelbacillen nach. — Krüger[151] konnte mit der Antiforminmethode auch das nicht nach Ziehl färbbare Tuberkulosevirus in allen untersuchten Fällen von Lupus auffinden. — Merkel[184] modifizierte das Uhlenhuthsche Verfahren zur Verwendung für die histologische Diagnose der Tuberkulose in der folgenden Weise:

Organstückchen werden frisch auf dem Gefriermikrotom in 30 bis 40 μ dicke Stückchen zerlegt und sofort in 15—20-proz. leicht erwärmter Antiforminlösung aufgefangen, in der sie sich fast momentan lösen. Nach kräftigem Zentrifugieren wird das entstandene Sediment 1—2mal in Aqua dest. gewaschen und auf gereinigte Objektträger, die vorher mit Eiweißglyzeringemisch oder Eiweißwasser bestrichen worden, ausgebreitet. Die Fixierung kann auch mit einer 2—3-promill. Sublimatlösung geschehen. — Auch in 10-proz. Formol oder Müllergemisch fixierte, ferner in Kaiserling oder in Alkohol aufbewahrte Organstücke eignen sich für diese Methode. — Schon in Paraffin eingebettete Gewebsstücke müssen mit Toluol, Alkohol und Wasser vorbehandelt werden.

Schnitter[261] entnimmt zum Nachweis von Tuberkelbacillen im Blut 10—15 ccm Blut, mischt es mit 30 ccm 3-proz. Essig- oder Zitronensäure. Nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde wird kräftig zentrifugiert, der Bodensatz mit Wasser aufgeschwemmt und 60 ccm 15-proz. Antiforminlösung zugesetzt. Nach $^1/_2$—1-stündigem Aufenthalt im Brutschrank wird zentrifugiert, das Sediment 2mal mit Wasser gewaschen und zu Ausstrichen verarbeitet. — Auch A. Lippmann[169] hat sich die von Schnitter angegebene Methode durchaus bewährt. —

Nach Beitzkes[14] interessanten Untersuchungen ist darauf zu achten, daß die an der Innenfläche der Wasserhähne sitzenden säurefesten Bakterien bei der Spülung nicht auf das Präparat gelangen und Anlaß zur Verwechslung geben.

Ligroinmethode: Das Prinzip dieser Methode begründet sich darauf, daß die Tuberkelbacillen vermöge ihrer wachsartigen Hülle eine stärkere Adhäsion zu dem fettlösenden Kohlenwasserstoff als zu dem wäßrigen Medium haben und infolgedessen beim Aufsteigen der spezifisch leichteren Kohlenwasserstofftröpfchen mit nach oben gerissen werden, wo sie sich dann an der Grenze der beiden Medien sehr zahlreich finden. —

Methode von L. Lange und Nitsche[159]: 5 ccm Sputum werden mit 50 ccm Normalnatronlauge gemischt, geschüttelt und bei Zimmer- oder Brutschranktemperatur bis zur völligen Homogenisierung stehen gelassen. Zusatz von 2 ccm Ligroin. Schütteln, bis eine dichte Emulsion entsteht. Im Wasserbad erfolgt eine Erwärmung auf 60—65°, bis eine scharfe Abscheidung des Kohlenwasserstoffes eingetreten ist. Aus der Grenzschicht unterhalb des Ligroins wird das Material entnommen und auf den vorher erwärmten Objektträger gebracht.

Modifikation nach Bogason[35]: An Stelle des Ligroins 18-proz. Petroleumäther, zur Homogenisierung 0,25-proz. Natron.

Kombination der Antiformin-Ligroinmethode und andere Kombinationen. G. Bernhardt[22] sowie Haserodt[108]

haben eine sehr glückliche Kombination der Uhlenhuthschen Methode mit dem Ligroinverfahren vorgeschlagen. Die Methode präsentiert sich folgendermaßen: Zu 5 ccm Sputum werden 20 ccm einer 20-proz. Lösung Antiformin hinzugefügt und mehrere Stunden bis zur völligen Homogenisierung stehen gelassen. Nach Zusatz von 25 ccm Leitungswasser und soviel Ligroins, daß eine 3—5 mm hohe Schicht über der Flüssigkeit steht, wird kräftig geschüttelt. Läßt man die Emulsion jetzt stehen, so scheidet sich der Kohlenwasserstoff in ca. 20—30 Minuten scharf ab, durch Erwärmen kann die Abscheidung begünstigt werden. — Die Entnahme des Materials erfolgt aus der Grenzschicht direkt unterhalb des Ligroins.

Nachprüfungen der Antiformin-Ligroinmethode durch v. Scheven[256], W. Münch[197], Bierotte[32], H. Hall[104], Skutetzky[268], Jacobson[133], Klose[142] u. a. haben ihren Wert glänzend bestätigt.

Koslow[147] hat eine Modifikation angegeben, die die Zentrifuge überflüssig macht: mit der halben oder gleichen Menge Antiformin homogenisierter Auswurf wird so verdünnt, daß auf 1 ccm Antiformin 10 ccm Wasser kommen. Die erhaltene Lösung wird mit der gleichen Menge einer Mischung von gleichen Teilen Aceton und Aether versetzt und kräftig geschüttelt. Beim Stehenlassen scheidet sich die Mischung in drei Schichten, deren mittelste die Tuberkelbacillen enthält. Der Antiformingehalt der Lösung darf nicht mehr als 7—8 Proz. betragen. Ein Vorteil der Methode ist das leichte Haften des Ausstriches auf dem Objektträger.

F. Loeffler[170—173] vermischt das Sputum mit 50-proz. Antiformin und kocht es auf, wodurch eine rasche Verflüssigung eintritt. Zu je 10 ccm der Lösung wird 1,5 ccm einer Mischung von Chloroform und Alkohol (1:10) gesetzt, geschüttelt, zentrifugiert und von der entstehenden Scheibe, die die Tuberkelbacillen enthält, werden mit Hühnereiweiß Ausstriche hergestellt.

F. Lorenz[175] schüttelt den Auswurf mit der 2—3-fachen Menge 15-proz. Antiformins bis zur völligen Homogenisierung, kocht im Reagenzglas auf, zentrifugiert und fertigt von dem Sediment, dem er einige Oesen Wasser zufügt, Ausstriche an.

Zahn[316] bediente sich zur Ausfällung der Tuberkelbacillen aus dem durch Alkali homogenisierten Sputum eines Zusatzes von Normalcalciumchloridlösung. Auch das mit 30 ccm 20-proz. Antiformins homogenisierte Sputum kann einen Zusatz von 1—2 ccm Normalcalciumchloridlösung, ev. 20 ccm Wasser erhalten. Jedoch muß hier eine Fixation des Niederschlages auf dem Objektträger durch Hinzufügen von etwas Sputum erfolgen.

Mende[183] hat das Zahnsche Verfahren nachgeprüft, es hat sich ihm außerordentlich bewährt, namentlich in Verbindung mit Antiformin.

Russ[243] hat zur Anreicherung von Tuberkelbacillen im Urin für den mikroskopischen Nachweis den elektrischen Strom benutzt: Er vermischt 1 oder 2 Teile Urin mit 1 Teil folgender Lösung: 1 Teil Aethylamin, 2 Teile Bromsäure, 4 Teile Milchsäure. Einen elektrischen Strom von 15 Volt und 2 bis 3 Milliamp. ließ er 8—18 Stunden lang auf eine Gesamtflüssigkeit von 100 ccm einwirken. Die Bacillen sammeln sich an dem negativen Pol an. Das Verfahren erwies sich als dem Zentrifugieren überlegen.

Die allgemeinen Prinzipien der Färbung.

Die Bakterienfärbung wie die histologische Färbung überhaupt bezweckt in erster Linie Sichtbarmachung von Objekten, die im natürlichen Zustande mikroskopisch nur unvollkommen oder gar nicht erkennbar sind, des weiteren aber die differente Darstellung verschiedener Elemente des Präparates. Da die Färbung, zum großen Teil wenigstens, wie erwähnt, ein chemischer Vorgang ist im Sinne einer Umsetzung von Gruppen des Farbstoffes mit entsprechenden Gruppen der zu färbenden Elemente, so ermöglicht sie ferner die Erkennung chemisch gleichartiger Substanzen auf Grund dieser mikrochemischen Reaktion. Zur Färbung der Bakterien werden fast ausschließlich die zuerst von C. Weigert (1875) empfohlenen Anilinfarben benutzt.

Die Anilinfarben kommen in Form von Pulvern in den Handel und sind einsäurige Salze von Farbbasen oder Alkalisalze von Farbsäuren. Man bezeichnet sie dementsprechend, obwohl ihre Reaktion neutral oder höchstens amphoter ist, nach Ehrlich als basische oder saure Farbstoffe. In Mischung saurer und basischer Farben kann es auch zur Bildung von Neutralfarben kommen, die als Salze von Farbbasen mit Farbsäuren aufzufassen sind. Die freien Basen resp. Säuren, besitzen eine weit geringere Färbekraft und Löslichkeit als ihre Salze und sind daher für histologische Zwecke nicht gebräuchlich. Die in der bakteriologischen Technik am meisten angewandten basischen Farbstoffe sind:

Fuchsin,
Methylenblau,
Safranin,
Bismarckbraun (Vesuvin),
Gentianviolett,
Methylviolett,
Kristallviolett.

Die sauren Anilinfarben sind zur Färbung der Bakterien nicht gebräuchlich; sie kommen aber in der bakteriologischen Technik gleichfalls zur Verwendung, als Entfärbungsmittel oder um in Gewebschnitten eine Kontrastfärbung der Gewebselemente gegenüber den Bakterien zu erreichen.

In die Klasse der sauren Anilinfarbstoffe gehören u. a.:

Eosin,
Säurefuchsin.
Fluorescin,
Congo.

Die chemische Konstitution der großen Menge von technisch verwendeten Anilinfarben kann hier nicht behandelt werden. Eine umfassende Zusammenstellung findet sich in dem ausgezeichneten Grundriß der Farbchemie von A. Pappenheim (Berlin)[217], an den sich die folgenden Ausführungen anlehnen.

Die Muttersubstanzen der Farbstoffe bezeichnet man als „Chromogene". In diesen ist ein wichtiges, mehrwertiges Atomkomplex, das „Chromophor", enthalten. Die Chromogene haben an sich keine färbende Qualität. Dieses Vermögen gegenüber animalischen Stoffen kommt nur solchen Körpern zu, die ausgesprochene basische oder saure Eigenschaften haben. Die Chromogene

aber sind fast neutral, nur von minimalem Säure- oder Basencharakter. Sie erhalten die färbende Fähigkeit jedoch durch Zutritt von sauren oder basischen Gruppen, die die Verankerung mit den zu färbenden Elementen bewirken und als „Auxochrome" bezeichnet werden. Diese sind also das eigentlich wirksame Prinzip in der Bildung der Farbe aus den Chromogenen. Je nachdem sich die Chromogene mit Säure- oder Basengruppen verbinden, entstehen Farben von verschiedener Acidität resp. Basicität. Treten z. B. basische Gruppen zu ein saures Chromophor, so entsteht ein schwächerer basischer Farbstoff als bei Verbindung der betreffenden basischen Gruppen mit einem basischen Chromophor.

Neben dem erwähnten Auxochrom, das den unbedingt zur Färbung nötigen Bestandteil des Farbstoffes bildet, kann dieser noch andere Gruppen aufnehmen. Wichtig sind eine Reihe salzbildender Gruppen von saurem Charakter, Nitro-, Sulfo-, Karboxyl-, Nitrosogruppen. Von diesen verleihen die Nitro- und Sulfogruppen dem Farbstoff unbedingt, die Karboxylgruppe nur unter bestimmten Umständen sauren Charakter. Das Farbmolekül kann neben den bereits erwähnten Gruppen noch andere verankert haben, die jedoch chemisch indifferenter sind. Sie bewirken durch Vergrößerung des Farbstoffvolumens eine Verstärkung der Nuance des Farbkörpers. Außer von dem Molekularvolum ist diese abhängig von dem Charakter des Chromophors, das an sich farblos resp. verschieden intensiv gefärbt sein kann.

Bei jeder Färbung tierischer Gewebe mit den Anilinfarben spielen sich chemische und physikalische Vorgänge ab. Auf die große Reihe von Tatsachen, die für die doppelte Natur des Färbeprozesses sprechen, kann hier nicht näher eingegangen werden.

Die chromophile Eiweißmaterie ist nach Pappenheim, soweit sie substantiv direkt (also ohne Beize [siehe unten]) färbbar ist, größtenteils amphophil bezw. amphoter, d. h. sie besitzt basische (Amido-) und saure (Karboxyl-) Gruppen gleichzeitig im Molekül, hat den Bau von Amidokarbonsäuren. Daraus folgt, daß das meiste substantiv färbbare Eiweiß bei singulärer Färbung mit nur einem Farbstoff sowohl in basischen wie in sauren Farbstoffen tingierbar ist. Die wahre chemische Chromophilie eines Substrates ergibt die differentielle Kombinationsfärbung mit neutralen Farbgemischen, wobei elektive Dissoziation eintritt, indem die Farbbase an das Eiweiß mit prävalierenden sauren Karboxylgruppen geht und umgekehrt. — Auch viele Plasmen erweisen sich so als basophil. Das basophile Eiweiß der Bakterien ist übrigens nicht Kerneiweiß, sondern Plastin. Es ist also nicht alles Basophile Kernsubstanz und alle Plasmensubstanzen sind nicht eo ipso oxyphil. — Ein gutes Reagens auf Kernsubstanz ist das Methylgrün, es hat die spezifische Eigenschaft Chromatin zu färben, Bakterien dagegen nicht oder doch nur schwach. — Umgekehrt färbt sich Chromatin mit allen basischen und sauren Farbstoffen. Hierauf beruht z. B. die Elektivität der Methyl-Pyroninreaktion.

Neben der chemischen Färbung besteht eine physikalische, indem die Substrate sich durch Diffusion und Oberflächenattraktion der Farblösung mit dieser tingieren.

Manche basischen Farbstoffe färben die einzelnen Elemente des Substrates in verschiedenen Nuancen. Man bezeichnet diesen Vorgang als Metachromasie.

Die Zahl der an den Farbbildungskern verankerten Seitengruppen ist bei den meisten Farben von hoher Bedeutung für die Echtheit der Färbung, d. h. für die mehr weniger feste Verbindung mit den zu färbenden Elementen und für die Beständigkeit gegenüber Entfärbungsmitteln (s. u.). Bei einer großen Zahl von auxophoren und salzbildenden Gruppen, zumal von gleichem Charakter, ist die chemische Verbindung mit den tierischen Elementen eine sehr feste, während bei einem an indifferenten Gruppen reichen Molekül die eventuelle Echtheit der Färbung nur auf der schweren Diffusibilität der mit großem Volum ausgestatteten Farbmoleküle beruht. (Chemische Echtheit im Gegensatz zur physikalischen.) Für die Echtheit der Färbung kommen neben der Echtheit der Farben auch die entsprechenden chemischen und physikalischen Verhältnisse der zu färbenden Materie in Betracht.

Eine chemische Färbung ist um so echter, je mehr auxophore bezw. haptophore Gruppen der Farbstoff hat und je größer die Zahl (also die Avidität) der adäquaten chromatophilen Gruppen der Materie ist.

Die physikalische Färbung ist dann am echtesten, wenn Größe des Farbmoleküls und Porenvolum der Materie adäquat sind.

Auf dem verschiedenen Elektionsvermögen der Farben und dem verschiedenen Grad der Echtheit der Färbung beruht die färberische Differenzierung.

Die Verschiedenheit des Elektionsvermögens kommt bei der Differenzierung durch progressive Färbung in Betracht; diese beruht darauf, daß man bei Färbungen in passenden Lösungen den Prozeß dann abbricht, wenn gerade nur die Elemente mit höherer Affinität zum Farbstoff gefärbt sind, z. B.: schon die Bakterien, noch nicht oder wenig intensiv Zellelemente.

Auf der verschiedenen Echtheit der Färbung beruht die regressive Färbungsmethode, bei der in gefärbten Präparaten mit Entfärbungsmitteln die weniger echt gefärbten Teile (z. B. Zellen) entfärbt werden, während andere Teile (z. B. Bakterien), gefärbt bleiben.

Es ist für die Wirkung des Entfärbungsmittels Grundbedingung, daß der Farbstoff in ihnen löslich sei; je löslicher er ist, desto leichter geht in der Regel die Entfärbung vor sich (um so „unechter" ist der Farbstoff).

Das schwächste Differenzierungsmittel ist das Wasser, das, wenn auch sehr allmählich, so doch genügend in Wasser lösliche Farben aus dem Präparat auszieht und somit differenziert. Die betreffenden Farben können aber noch „alkoholecht" sein. Bedeutend kräftiger als Wasser wirkt nämlich Alkohol farbstoffentziehend. Allerdings ist dazu, wie Günther (Lehrb.) gezeigt hat, absoluter Alkohol, sofern die Präparate ganz trocken sind, unbrauchbar. Verdünnte alkoholische Lösungen entfärben jedoch ausgezeichnet, natürlich je nach dem Konzentrationsgrad verschieden schnell. Besonders kräftig wirkt der Alkohol, wenn man ihn als Alcohol absolutus abwechselnd mit Wasser verwendet, indem die dabei entstehenden starken Diffusionsströme die Farbe extrahieren. Der differenzierenden Wirkung des Alkohols kommt etwa die des Anilins und Nelkenöls gleich; noch stärker wirkt Glyzerin. Die Säuren sind das stärkste Entfärbungsmittel; am gebräuchlichsten ist eine stark verdünnte Essigsäure,

wirksamer sind Salzsäure, Schwefelsäure und Salpetersäure. Ihre Wirkung kann noch durch Verwendung in alkoholischer statt wäßriger Lösung erhöht werden. Am häufigsten findet salzsaurer Alkohol Verwendung, während Zusatz von Salpetersäure zu Alkohol sich weniger eignet, da dadurch eine Oxydation des Alkohols herbeigeführt wird.

Die entfärbende Wirkung der Säure kann einmal auf einer chemischen Zersetzung des Farbstoffs beruhen, dann aber kann die Säure (bei basischen Farbstoffen) sich mit der an sich schwer löslichen Base zu einem leicht löslichen Salz verbinden, nachdem sie die Base aus ihren Verbindungen mit dem zu färbenden Substrat an sich gerissen hat. Die entfärbende Wirkung durch Wasser, Alkohol und Säure kann sowohl gegenüber chemischen wie physikalisch gebundenen Farbstoffen statthaben; ist aber ein Farbstoff durch Wasser und Alkohol nicht extrahierbar, so handelt es sich um eine physikalisch echte Färbung, bei Resistenz gegenüber der Säure um eine chemisch echte Verbindung. (Es gibt auch chemische echte Verbindungen, die durch chemische Mittel extrahierbar sind.) Statt der Differenzierung mit Säure kann man auch mit sauren Farbstoffen extrahieren, oder einen alkoholischen Farbstoff durch einen echter färbenden austreiben.

Bei der progressiven wie bei der regressiven Methode kann mit mehreren basischen Farbstoffen nacheinander gefärbt und auf diese Weise eine differente Färbung erzielt werden.

Im Gegensatz zur monochromatischen (progressiven oder regressiven) Färbung beruht diese polychromatische Färbung in erster Linie auf dem Elektionsvermögen der Farben. Die polychromatische Färbung kann sowohl mehrzeitig (d. h. mit mehreren Farben nacheinander) wie einzeitig (d. h. mit einem Farbengemisch) vorgenommen werden. Differenzen in der Färbung kommen hier vor allem durch die verschiedene Affinität der einzelnen Substrate zu den Farben zustande. Diese Beziehungen zwischen Farbe und Substrat sind sowohl chemischer wie physikalischer Natur, so daß es sich auch bei der polychromatischen Färbung um chemische und physikalische Vorgänge zwischen Farbe und Substrat handelt (physikalische und chemische „Elektion").

Daneben bestehen auch Beziehungen der einzelnen Farbstoffe untereinander, indem der eine als „Beize" (s. u.) für den andern wirkt oder ein Farbstoff den anderen extrahiert.

Bei Gemischen von Farben gleichen (basischen oder sauern) Charakters beruht die Elektion der Farben nach Pappenheim im wesentlichen auf dem Verhältnis der Dichtigkeit der Materie zu der Größe der Farbstoffmoleküle. In einer solchen Farbmischung bevorzugen also helle Farben (mit kleinem Volum), Bakterien mit adäquatem (kleinen) Porenvolum und umgekehrt.

In neutralen Farbgemischen (Gemische von sauren und basischen Farbstoffen) fallen neutrale Farbsalze aus, die in einem geringen Ueberschuß einer der Komponenten wieder löslich sind. In Verbindung mit der zu färbenden Materie wird das neutrale Salz gesprengt und der basische resp. saure Anteil verbindet sich mit entsprechenden Gewebselementen, wodurch eine distinkte Färbung erzielt wird. Diese Färbungsmethode gibt daher ein genaues Urteil über die chemische Beschaffenheit der zu färbenden Elemente.

Es gibt einzelne Bakterienarten, die sich der Einwirkung der Farbstoffe gegenüber sehr resistent verhalten, ebenso nehmen gewisse Bestandteile der Bakterien (Geißeln, Sporen) gleichfalls die gewöhnliche wäßrig-alkoholische Lösung der Anilinfarben nur schwer an. Diese Tatsache ist aus dem Vorhergehenden verständlich.

Es ist bereits erwähnt, daß zum Zustandekommen der Färbung sowohl die Farbe wie das zu färbende Substrat gewisse Eigenschaften besitzen müssen. Da wo nicht genügend aktive Gruppen auf seiten der Farbe oder der zu färbenden Substanz vorhanden sind, oder Porenweite der Materie und Größe des Farbstoffmoleküls inadäquat sind, kann die gewöhnliche substantive Färbung nicht zustande kommen. Man kann hier zunächst unter Umständen schon durch physikalische oder physikalisch wirkende Mittel die Färbung ermöglichen resp. verstärken, indem man Substrate und Farblösungen modifiziert (z. B. Dichtung der Materie durch Wasserentziehung, Erwärmung der Farblösungen und damit Erhöhung der Diffusibilität).

Chemische Stoffe, die imstande sind, mit bestimmten Farben Färbungen von gewöhnlich nicht färbbaren Materien zu ermöglichen und unechte Färbungen in echte zu verwandeln, bezeichnet man als Beizen, den Färbungsmodus als adjektiven im Gegensatz zum substantiven.

Die chemischen Stoffe, die die Chromatophilie des Gewebes beeinflussen, sind echte Beizen, während man als uneigentliche Beizen Substanzen bezeichnet, die die Dissoziationsfähigkeit des Substrates für Farbsalze erhöhen, daneben auch die Diffusibilität der Materie für den Farbstoff erleichtern. Zu den uneigentlichen Beizen gehören die Alkalien, die physikalisch Auflockerung des Gewebes verursachen, dann aber auch chemisch wirken, indem nach Pappenheim das Alkali das Farbsalz zersetzt, die Säure an sich reißt und die Base zur Färbung frei macht, ferner das Anilinöl u. a. m.

Die Erhöhung der Färbkraft durch Alkalizusatz wurde zuerst von R. Koch beobachtet. Er fügte zu 0,4—3,0 konz. alkoholischer Lösung von Methylenblau 100 Wasser und 0,1 einer 10-proz. Kalilauge.

Löffler[170] stellte eine etwas stärkere, sehr gebräuchliche alkalische Methylenblaulösung nach folgendem Rezept her:

30 ccm konz. alkohol. Methylenblaulösung.
100 ccm 0,01-proz. Kalilauge.

Durch einen höheren Alkalizusatz wird die Löslichkeit des Farbstoffes herabgesetzt. In dem Stadium der unvollkommenen Lösung (Unnas Schwebefällung), das der Ausfällung vorausgeht, färbt die Farblösung besonders intensiv, wahrscheinlich durch Begünstigung der physikalischen Bindung.

Die beizende Wirkung des Anilinöls beruht auf der Schaffung einer leichteren Diffusibilität des Farbstoffes durch das Oel eventuell auch auf einer Verbindung der Farben mit diesem Körper.

Die Anilinwasserfarblösungen sind zuerst von Ehrlich[59] angegeben worden; sie stellen eine Mischung von gesättigter wäßriger Anilinlösung mit alkoholischer Farbstofflösung dar. Die gesättigte Anilinwasserlösung ist wenig haltbar und wird daher nur in kleinen Mengen stets frisch folgendermaßen bereitet:

Die Kuppe eines Reagenzglases wird mit hellem Anilinöl gefüllt, darüber wird bis zur Hälfte des Glases destilliertes Wasser gegossen.

Nunmehr wird das Oel durch kräftiges Schütteln gut im Wasser verteilt und darnach die Mischung durch ein angefeuchtetes Filter filtriert. Das Oel bleibt im Filter zurück. Die gesättigte Anilinwasserlösung wird zur Färbung mit einer Fuchsin- oder Gentianaviolettlösung versetzt, bis auf der Oberfläche der Mischung ein metallisch glänzendes Häutchen von ungelöstem Farbstoff sich bildet. Vor dem Gebrauch filtriert man die Lösung oder läßt sie nach Günther (Lehrb.) 24 Stunden sedimentieren.

London[174] ersetzte das Anilin durch Nelkenessenz, was bei Schutz vor Licht die Dauerhaftigkeit der Lösung bedeutend erhöht (bis zu ca. 2 Monaten).

Statt Anilin sind ferner eine Reihe von anderen Substanzen zur Farblösung als beizende Bestandteile vorgeschlagen, von denen 5-proz. wäßrige Karbolsäure nach Ziehl[318] die gebräuchlichste ist. Rezept der Karbolfuchsinlösung: Fuchsin 1, Alkohol 10, 5-proz. wäßrige Karbolsäure 100.

Czapelewsky[52 u. 53] verwandte statt des Alkohol Glyzerin: 5 Acid. carbol. cryst. werden in der Reibschale mit 1 Fuchsin verrieben, mit 150 Glyzerin innig vermischt und erhalten einen Zusatz von 100 Wasser.

Kühne[154] empfiehlt Karbolmethylenblaulösung: 1,5 Methylenblau, 10 Alkohol abs., 100 5-proz. Karbolsäure.

Die echten Beizen haben eine starke chemische Affinität, einerseits zum Substrat, andererseits aber auch zur Farbe und werden da angewandt, wo eine direkte Verankerung des Farbstoffs an das Substrat nicht erfolgen kann, oder eine säurefeste Echtheit der Färbung erzielt werden soll. Es handelt sich hierbei also um eine indirekte Verbindung der Farbe mit dem Gewebe vermittels der Beize. Die säurefeste Verbindung zwischen Beize und Farbstoff bezeichnet man als Lack. Bei der Verbindung des Farblacks mit dem Substrat findet keine Spaltung, wie bei der substantiven Färbung statt, sondern eine direkte Verankerung. Basische Farben erfordern zur Beizung saure Beizen und umgekehrt. Die Lackfärbung ist dann am echtesten, wenn man vermittels der Beize die natürliche Chromatophilie des Gewebes umkehrt (Inversion) und nun eine Farbe wirken läßt, die einen dem ursprünglichen Substrate gleichen Charakter hat. Da auch die Beizen resp. Lacke elektiv auf die einzelnen Elemente des Substrats wirken und ihre Verbindung mit diesen verschieden echt sind, so ist die Möglichkeit der Differenzierung gebeizter Präparate gegeben (Pappenheim[217a]).

Eine beizende Wirkung neben der differenzierenden kommt einer großen Reihe von histologisch verwendeten Salzen zu, von denen das wichtigste das Jodkali ist. Sie wirken auf einzelne Teile des Substrats beizend, indem sie in diesem Tripelverbindungen von Gewebselementen Farbsalz und Entfärbungssalz bilden. — In anderen Teilen bewirken sie eine Lockerung des Farbstoffes, die dessen nachheriges Ausspülen mit Alkohol erleichtert, oder sie bilden nur einen locker am Gewebe haftenden Lack. Das Jodjodkalium wurde von Gram[101] in die histologische Technik eingeführt. Der Unterschied gegenüber der gewöhnlichen Beizung besteht darin, daß hier das Beizen nach der Färbung und nicht vor derselben geschieht.

Die Natur der Farbsalze ist für die Echtheit der Färbung insofern wichtig, als z. B. Pararosaniline dauerhaftere Verbindungen mit dem

Jod eingehen als die Rosanilinc. Man verwendet daher zur Gramschen Färbung ausschließlich die Pararosanilinc. Eine Reihe von Bakterien bilden mit Jodkali und dem Pararosanilinfarbstoff die erwähnte feste Verbindung, die durch Alkohol nicht auswaschbar ist, während andere Bakterien den Farbstoff nach der Jodbehandlung leicht an Alkohol abgeben. Erstere Bakterienarten bezeichnet man als solche, die sich „nach Gram färben", letztere als solche, die sich „nach Gram nicht färben". Zu den nach Gram färbbaren Bakterien gehört Mäuseseptikämie-, Milzbrand-, Tuberkel-, Lepra-, Tetanus-, Diphtherie-, Schweinerotlaufbacillus, pyogene Streptokokken und Staphylokokken, Micrococcus tetragenus, Diplococcus pneumoniae und das Mycel des Actinomyces. Nach Gram nicht färbbar sind unter anderem Typhusbacillen, Bacterium coli, Rotz-, Cholera-, Hühnercholerabacillus, Kaninchenseptikämiebacillus, Bacillus pneumoniae (Friedländer), Bac. pyocyaneus, Koch-Weeksscher Bac., Ulcus-molle-Bacillus, Influenzabacillus, Pestbacillus, Rauschbrandbacillus. Bacillus des malignen Oedems, Gonococcus, Meningococcus, Micrococcus catarrhalis, Recurrensspirillum, Syphilisspirochäte.

Vorbereitung der Präparate zur Färbung.

Zur Färbung der Bakterien erfordert das Material gewisse Vorbereitungen, die den Zweck haben, die Bakterien zu fixieren und der Färbung besser zugänglich zu machen. Diese Vorbereitungen sind für Ausstrichpräparate und für Präparate von Gewebsschnitten verschieden und seien im nachstehenden getrennt geschildert.

Vorbereitung der Ausstrichpräparate zur Färbung.

I. Vorbereitung des Materials und Ausstreichen. Flüssigkeiten werden mit einer ausgeglühten Platinöse auf das Deckglas oder den Objektträger (besondere Reinigung s. S. 338) gebracht und in gleichmäßig dünner Schicht ausgebreitet. Sind in der Flüssigkeit zellige Elemente vorhanden, so würden sie bei dem Ausstreichen mit dem Platindraht leicht zerstört werden. Es kann aber für viele Fälle, namentlich da, wo es sich um die Entscheidung der Frage handelt, ob die Bakterien innerhalb der Zellen liegen oder nicht, ob die Zellen morphologisch alteriert sind oder nicht, wesentlich auf ihre Intaktheit ankommen. Man verfährt deshalb beim Ausstreichen von Blut oder Eiterpräparaten nach Nikiforoff[210] so, daß man ein Deckglas an seiner Kante mit der Flüssigkeit benetzt und dann mit diesem über ein anderes, wagrecht liegendes Deckglas oder einen Objektträger hinwegstreicht, wobei das erstere mit dem zweiten etwa einen Winkel von 45° bildet. Es breitet sich alsdann das Material in gleichmäßig dünner Schicht auf dem zweiten Deckglase aus und die Zellen bleiben gut erhalten. Man erreicht dasselbe auch nach folgender Methode: Auf die Mitte eines mit Alkohol und Aether gereinigten Deckglases kommt ein Tröpfchen der zu untersuchenden Flüssigkeit. Ein zweites gleichfalls sorgfältig gereinigtes Deckglas wird so auf das erste gelegt, daß die Ecken etwas überstehen. Es breitet sich dann die Flüssigkeit in kapillarer Schicht zwischen beiden Deckgläsern aus, vorausgesetzt, daß diese absolut rein sind. Unter Vermeidung jeden Druckes

zieht man nun die Deckgläser auseinander und erhält zwei Präparate, in denen die Flüssigkeit gleichmäßig dünn ausgebreitet ist, ohne daß die vorhandenen Zellen ihre Gestalt verändert haben.

Wenn es sich um den Nachweis von Bakterien in frischen Geweben handelt, kann man zuvor durch Verreibung von Gewebspartikeln eine Emulsion herstellen und diese auf das Deckglas bringen. Zweckmäßig aber streicht man mit dem in der Pinzette gehaltenen Deckglas über die frische Schnittfläche des zu untersuchenden Gewebsteiles, wobei Zellen auf dem Deckglas haften bleiben.

Kulturen von festen Nährböden werden in einem Tropfen Wasser direkt auf dem Deckglase verrieben. Sollen nicht die Bakterien als einzelne Individuen, sondern in ihrem natürlichen Zusammenhange als Kolonien untersucht werden, so fertigt man sogenannte „Klatschpräparate" an.

Ein in der Flamme sterilisiertes und wieder erkaltetes Deckglas wird auf die zu untersuchende Bakterienkolonie, die zweckmäßig auf einer Platte oder Petrischale angelegt wurde, leicht angedrückt. Hebt man mit der Pinzette das Deckglas alsdann vorsichtig ab, so haftet der ganze Verband der Bakterien an dessen Unterseite und kann zu einem Dauerpräparat weiterverarbeitet werden.

II. Trocknung. Das mit dem Ausstrich beschickte Deckglas läßt man entweder lufttrocken werden oder beschleunigt die Trocknung durch Einlegen in den Brutschrank oder leichtes Erwärmen über der Flamme des Bunsenbrenners. Die bestrichene Seite ist nach oben zu halten und jede stärkere Erhitzung des Präparates zu vermeiden. Man kann den Prozeß dadurch beschleunigen, daß man das Präparat dem Strahle eines Chloralciumgebläses aussetzt oder erwärmte Luft aus einer bei Zahnärzten gebräuchlichen Luftspritze darüberstreichen läßt (Miller[189]).

III. Fixierung. Da die Präparate im Verlauf der Färbung stets einer Wasserspülung unterzogen werden, so würde die auf dem Deckglas haftende, nur einfach angetrocknete Schicht natürlich wieder abgespült. Nichtfixierte eiweißhaltige Elemente bilden ferner mit den Farblösungen Niederschläge. Die Bakterienschicht muß also vor der Färbung auf dem Deckglas fixiert werden. Dieses geschieht für gewöhnlich nach Koch[143–145] (1881) durch Erhitzung, die ein festes Haften der zu färbenden Elemente an dem Deckglas bewirkt. Nach Untersuchungen von Hehewerth[112] ist der Wert der Fixation durch Hitze nur ein beschränkter, indem nach seinen Untersuchungen auch bei vorsichtiger Wasserspülung im Durchschnitt 75 Proz. der Keime vom Deckglas abgespült werden. Er empfiehlt daher nach Kleins[140] Vorgang Färbung vor der Fixation und Vermeidung der Wasserspülung (cf. Kleinsche Methode der Sporenfärbung, und die Bakterienzählmethode desselben Autors unten). Zur Fixierung wird das mit der Pinzette gefaßte Deckglas in horizontaler Haltung mit der Schichtseite nach oben dreimal hintereinander durch die nicht leuchtende Flamme eines Bunsenbrenners gezogen mit der Geschwindigkeit etwa, mit der man Brot schneidet. Die Fixierung durch höhere Temperaturen kann auch in der Weise geschehen, daß man die Deckgläschen für einige Zeit mit der beschickten Seite nach oben auf das eine Ende eines horizontal auf einem Dreifuß liegenden Kupferblechs legt, dessen anderes Ende durch eine Flamme erwärmt wird.

Da wo eine Erhitzung der Präparate vermieden werden soll, erfolgt die Fixation durch Einlegen in Alcohol abs., in absoluten Alkohol + Aether aa, in konzentrierte Sublimatlösung, in Acetonlösung, durch $^1/_2$—2 Minuten langes Einwirkenlassen von Osmiumdämpfen oder 4—5 Sekunden langes Einwirken von Formalindämpfen.

Präparate von Milch werden nach der Fixation noch durch Aether von Milchfett befreit.

Aus Blutpräparaten kann man nach Günther[102] durch 1- bis 2-proz. Essigsäure oder 2- bis 3-proz. wäßrige Pepsinlösung das Hämoglobin vor der Färbung extrahieren.

Die Vorbereitung der Gewebe zur Färbung.

Nicht so einfach wie bei Deckglaspräparaten sind die Vorbereitungen zur Färbung dann, wenn es sich darum handelt, die pathogenen Bakterien im Gewebe nachzuweisen. Eine Betrachtung im ungefärbten Zustand nach einer Methode, die etwa dem hängenden Tropfen entspräche, gibt es nicht. Man kann allenfalls noch auf Grund der verschiedenen Resistenz der Bakterien und Gewebselemente die letzteren durch chemische Mittel (Säuren oder Alkalien) zerstören und dann die Bakterien im Strukturbild zur Anschauung bringen, ein Verfahren, das aber natürlich nur höchst unbefriedigende Resultate gewähren könnte und praktisch kaum je Anwendung findet. Die Untersuchung geschieht vielmehr fast ausschließlich nach Färbung des Gewebsschnittes. In Fällen, in denen eine schnelle Prüfung von Organstücken auf Bakterien nötig und eine Herstellung von Organschnitten zu umständlich ist, empfiehlt Sticker[279] Abdrücke von Organen wie folgt zu nehmen: Nachdem man sich eine glatte Schnittfläche an den Organen hergestellt hat, wird ein Objektträger ohne Verschiebung leicht auf die Fläche aufgedrückt. Die Abdrücke gelingen gut, wenn die Organe nicht zu feucht sind, sonst muß man die Schnittfläche durch Eintrocknen oder durch Einlegen in Alkohol oder Formol erst vorbereiten. Das Blutfärbungsverfahren von May & Grünwald[181] hat sich bei der Färbung solcher Organabdrücke bewährt. Die Anordnung der Gewebselemente und der Mikroben auf den Abdrücken entspricht der Anordnung in den Organen.

Soll die Untersuchung eines Gewebes in Schnitten sofort nach der Entnahme des Organs geschehen, so werden Stückchen durch Aether zum Gefrieren gebracht und mittels des Mikrotoms (s. u.) zerlegt. Für feinere Untersuchungen ist Fixierung und Härtung erforderlich.

Die Fixation hat den Zweck, die ursprüngliche Struktur der Elemente zu konservieren, nachträgliche postmortale Veränderungen, vor allem eine Vermehrung in den Geweben vorhandener oder nach dem Tode eingedrungener Keime zu verhindern und ferner den Eiweißkörpern ihre Quellbarkeit und Wasserlöslichkeit zu nehmen. Die Härtung liefert die Möglichkeit, genügend dünne Schnitte anzufertigen.

1. Entnahme des Materials: Die möglichst bald nach dem Tode der Leiche entnommenen Organe werden oberflächlich mit Sublimat abgespült, dann werden aus dem Innern Stücke von höchstens

Haselnußgröße herausgenommen und in wohlverschlossene Gläser mit absolutem Alkohol gebracht.

II. Fixation: Von den zahlreichen in der histologischen Technik verwandten Fixationsmitteln kommen für bakteriologische Zwecke nur die in Betracht, die eine sichere keimtötende Fähigkeit besitzen.

Wir fixieren die Gewebe in der bakteriologischen Technik, wo es mehr auf den Nachweis der Bakterien als auf die feinere Darstellung der histologischen Verhältnisse ankommt, fast nur in Alkohol, der gleichzeitig härtende Eigenschaften besitzt. Die in der Histologie sonst verwandten Härtungs- und Fixierungsmittel werden in der bakteriologischen Technik weniger benutzt.

Die fixierende und härtende Eigenschaft des Alkohols beruht darauf, daß er wasserentziehend wirkt. Da der Alkohol ein geringeres spezifisches Gewicht hat als Wasser, so sinkt das dem Gewebe entzogene Wasser nach unten, während weiter nach oben der Alkohol absolut bleibt. Man läßt daher die Organstücke nicht auf den Boden des Gefäßes fallen, sondern lokalisiert sie auf eine am Boden des Glases befindliche Schicht von Fließpapier oder Watte, damit sie allseitig von absolutem Alkohol umgeben bleiben. Stücke, die in Alkohol nicht untertauchen, werden auf Korken angesteckt und auf diesen umgekehrt in Alkohol eingebracht. Die Fixation und Härtung in Alkohol soll mindestens 24 Stunden dauern, eventuell unter mehrmaliger Erneuerung des Alkohols.

Da, wo es darauf ankommt, neben den Bakterien auch Feinheiten der Gewebsstruktur zur Anschauung zu bringen, eignet sich der Alkohol wegen seiner schrumpfenden Wirkung nicht zur Fixation. Er wird in diesen Fällen zweckmäßig durch Formalin oder Sublimat ersetzt.

Bei Fixation mit Formalin kommen die Präparate für 3 bis 24 Stunden in eine 4—10-proz. Lösung und danach zur Härtung in Alkohol.

Die Fixation durch Sublimat erfolgt in einer gesättigten Lösung (3—6 Stunden) oder einem Gemisch von 3 Teilen Sublimat, 1 Teil Eisessig und 100 Teile destillierten Wassers (24 Stunden). Nach der Fixation folgt 24-stündige Auswässerung zur Entfernung des Sublimats, Einlegung in 70-proz. Alkohol mit Jodzusatz unter häufigem Wechseln. Nachhärten mit Alkohol.

III. Einbettung: Für die gewöhnlichen Zwecke genügt auch die in Alkohol erreichte Konsistenz zum Zerlegen der Stücke in feine Schnitte.

Doch ist die Konsistenz der in Alkohol fixierten Organstücke keine so hohe, daß man sehr feine Schnitte erzielen könnte. Zu dem Zweck muß das Gewebsstück in einen festeren Zustand übergeführt werden. Das geschieht, indem man die Hohlräume des Gewebes vor dem Schneiden mit einer erstarrenden Masse durchtränkt.

Gefriermethode. Die Gewebsstückchen können frisch verarbeitet werden oder auch vorher in einer beliebigen Weise fixiert sein. Das Gefrieren wird am besten mit Kohlensäure (in Bomben vorrätig) oder, wenn man nicht oft Gelegenheit zum Schneiden hat, mit Aether ausgeführt.

Sehr zweckmäßig ist das Anetholverfahren von Kühne[154–156]. Die in Alkohol fixierten Stücke werden sorgfältig abgetupft und in einer Größe von etwa $^1/_2$ cm Durchmesser in reines Anisöl eingelegt, in

dem sie bei Körpertemperatur etwa 12 Stunden liegen bleiben. Dann werden sie mit Hilfe eines Aethersprays auf der Objektplatte eines Mikrotoms zum Gefrieren gebracht und geschnitten. Die Schnitte werden in warmem Anisöl aufgetaut, mit Fließpapier abgetupft und mehrmals in Alkohol gewaschen, in dem sie dann bis zur Färbung aufbewahrt werden. Diesem immerhin eingreifenden und die Gewebsstruktur alterierenden Verfahren sind jedoch die Methoden der Durchtränkung mit Paraffin oder Celloïdin vorzuziehen.

Paraffindurchtränkung. Im Handel kommen mehrere Sorten festen Paraffins vor, die sich durch ihren Schmelzpunkt unterscheiden. Man kann durch geeignete Vermischung von Paraffinsorten von höherem und niederem Schmelzpunkt eine Mischung von bestimmtem Schmelzpunkt erzielen. Im Sommer benutzt man Paraffin von höherem Schmelzpunkt (etwa 60°) als im Winter (etwa 50°). Die Durchtränkung des Gewebes erfolgt bei höherer Temperatur mit dem verflüssigten Material, das nachher bei gewöhnlicher Temperatur wieder erstarrt und so die Zerlegung des mit ihm durchtränkten Gewebes in feinste Schnitte gestattet.

Mit Paraffin durchtränkte Organe liefern die dünnsten Schnitte. Außerdem hat die Methode der Paraffindurchtränkung den Vorzug, daß der folgende Schnitt stets an dem vorhergehenden haften bleiben kann, so daß sich Serienschnitte anfertigen lassen. Der Gang des Paraffineinbettungsverfahrens ist folgender: Die in absolutem Alkohol gehärteten Organstücke müssen zunächst mit dem verflüssigten Paraffin durchtränkt werden. Dies ist jedoch ohne weiteres nicht möglich, da Paraffin und Alkohol sich nicht miteinander mischen. Es muß daher zuerst der Alkohol durch einen Körper vertrieben werden, der die Fähigkeit hat, sich sowohl mit dem Alkohol wie mit dem Paraffin zu mischen; ein solcher Stoff ist das Xylol. Die Stücke kommen daher aus Alkohol in Xylol, wo sie je nach der Größe des Objekts verschieden lange (3 bis 6 Stunden) bleiben, bis sie vollständig von Xylol durchtränkt sind. Um das Xylol wieder auszutreiben und das Paraffin allmählich eindringen zu lassen, kommen sie in einen Thermostaten, der etwa auf 50° eingestellt ist, in eine Mischung von Xylol und Paraffin in einem offenen Gefäß. In dem Maße, als hier das Xylol verdunstet, dringt das Paraffin in die Gewebsspalten ein. Ist das Xylol ganz verdunstet, so müssen die Präparate noch für etwa 12 Stunden gleichfalls im Thermostaten in geschmolzenes Paraffin gelegt werden.

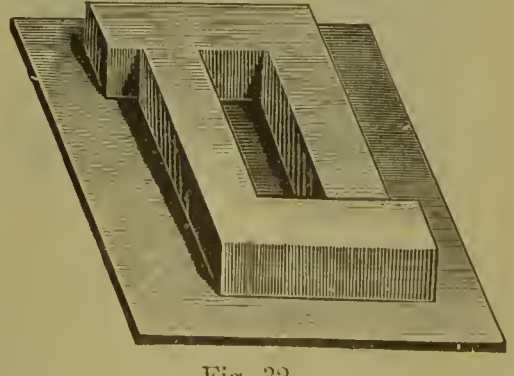


Fig. 32.

Ist die Durchtränkung mit Paraffin vollendet, so erfolgt die Einbettung des Präparates in dieser Masse. Man gießt zu dem Zweck das zur Durchtränkung benutzte geschmolzene Paraffin in einen Einbettungsrahmen aus Metall (Fig. 32), der eine Glasplatte als Unterlage hat. In die noch nicht vollständig erstarrte Paraffinmasse bringt man dann das Material und gibt ihm die zum Schneiden gewünschte Lage (man „orientiert" es). Der Einbettungsrahmen läßt sich auch durch ein Kästchen aus Papier oder ein mit Vase-

line ausgestrichenes Glasschälchen ersetzen. Je schneller das Paraffin erstarrt, desto homogener und geeigneter zum Schneiden wird es. Man bringt deshalb, sobald das Präparat orientiert ist, den Rahmen in kaltes Wasser. Aus dem erstarrten Paraffin wird mit dem Messer das Präparat so herausgeschnitten, daß ihm allseits noch ein Mantel von Paraffin anhaftet. Das Aufkleben des Paraffinblocks auf Holzklötzchen geschieht in der Weise, daß man an der Unterseite des Blockes das Paraffin durch leichtes Erwärmen verflüssigt und dann das Präparat auf Klötzchen bringt, die vorher in verflüssigtes Paraffin eingetaucht waren. Nach dem Erstarren haftet der Paraffinblock fest auf dem Holz. Die Präparate sind nunmehr zum Schneiden fertig.

Da man in der Regel sehr dünne Paraffinschnitte herstellt und vor der Färbung die Durchtränkungsmasse entfernen muß, würden die zarten Objekte, wenn man sie ohne weiteres den nun folgenden Färbeprozessen aussetzt, leicht bei Uebertragung aus einer Flüssigkeit in die andere zerreißen oder sich zusammenfalten. Man klebt deshalb die Paraffinschnitte auf Deckgläsern oder Objektträgern auf. Hierzu kann man ein wenig Hühnereiweiß eventuell mit Glyzerinzusatz benutzen, das auf das Glas gerieben wird, oder eine Lösung von einem Teil Kollodium und zwei Teilen Nelkenöl oder eine andere klebende Masse. Da jedoch diese Substanzen stets, wenn auch nur in geringem Grade, die Farbe annehmen und dadurch störend wirken, so ist das folgende Verfahren zweckmäßiger: Man bringt einen Tropfen erwärmten Wassers auf das sorgfältig gereinigte Glas, legt den Schnitt darauf, breitet ihn sorgfältig aus und tupft das überschüssige Wasser ab. Das so aufgelegte Präparat kommt für 12 bis 24 Stunden in einem Thermostaten von 37°, wo die letzten Spuren des Wassers verdunsten. Der Schnitt haftet alsdann durch kapillare Attraktion so fest auf dem Glas, daß er die folgenden Prozeduren verträgt, ohne sich zu lösen.

Fig. 33.

In dem unteren Schranke des abgebildeten (Fig. 33) Paraffineinbettungsapparates werden bei 57° die Objekte in Paraffin eingelegt, in dem darüber befindlichen Aufsatzschrank, der auf 37° eingestellt ist, werden die Schnitte getrocknet und auf dem Objektträger ausgebreitet.

F. Henke & Zeller[114] haben zur Schnellhärtung und Schnelleinbettung Aceton verwendet: Sie legen kleine frische Gewebsstücke in reines wasserfreies Aceton, das sich über geglühtem Kupfersulfat befindet. Die Acetonmenge soll das 25-fache Volumen der Gewebsstücke betragen, die Zeitdauer richtet sich nach der Größe des Gewebsstückes, für 1 ccm genügt eine Zeit

von 1—1/2 Stunden bei 37°. Nach dem Härten kommen die Stückchen direkt in Paraffin von 52—56° Schmelzpunkt. Nach 1/2—1 1/2 Stunden Aufenthalt im Paraffinofen erfolgt die Einbettung. —

A. Brunk[43] modifizierte die Methode, indem er zur besseren Entwässerung zwischen Aceton und Paraffineinbettung einen 5 bis 10 Minuten langen Aufenthalt in Xylol einschob. Die Paraffindurchdringung des Gewebes geht so besser und schneller vor sich. —

Celloidindurchtränkung. Die Celloidindurchtränkung (Blochmann[33], Schiefferdecker[257]) bietet gegenüber der durch Paraffin den Vorzug, daß die Einschlußmasse nicht entfernt zu werden braucht, da sie bei der Färbung nicht stört. Das ist besonders für Organe mit großen Hohlräumen wichtig. Ein Nachteil der Celloidindurchtränkung beruht darin, daß das Celloidin die Behandlung mit Nelkenöl und auch mit absolutem Alkohol nicht verträgt, aus letzterem Grund eignet sich für die Gramsche Färbung (s. unten) nicht. Celloidin ist eine Art festen Kollodiums, das in Tafeln etwa von der Härte des Kalbsknorpels in den Handel kommt und die Eigenschaften hat, sich in absolutem Alkohol und Aether zu lösen. Zu histologischen Zwecken stellt man sich zwei Lösungen von Celloidin in Alkohol und Aether her, eine dünnflüssige, die etwa die Konsistenz eines dicken Oeles hat, und eine dickflüssige von Sirupkonsistenz.

Die Präparate kommen nach der Fixation in Alkohol zuerst in eine Mischung von Alkohol und Aether zu gleichen Teilen für 24 Stunden. Dann kommen sie je nach der Größe des Objekts verschieden lange (24 Stunden bis mehrere Tage) in die dünnere Lösung von Celloidin und für gleich lange Zeit in die konzentriertere. Bei kleinen Objekten, wie sie in der bakteriologischen Technik in der Regel vorliegen, genügt eine 1—2-tägige Durchtränkung.

Die durchtränkten Stücke bringt man in ein flaches Schälchen, übergießt sie mit Celloidinlösung und läßt an der Luft allmählich den Aether und Alkohol verdunsten, wobei das Celloidin erstarrt. Ist die Eindickung so weit vorgeschritten, daß man eine Masse erhält, die man mit der Fingerkuppe nicht mehr eindrücken kann, so ist der Durchtränkungsprozeß beendet. Man schneidet die Gewebsstücke mit einem anhaftenden Celloidinmantel aus der Glasschale heraus und bringt sie für 1—2 Tage in Alkohol (70 Proz.). Das Material ist alsdann schnittfähig, kann jedoch unbeschadet noch längere Zeit im Alkohol aufbewahrt werden.

Die Befestigung auf Kork- oder Holzklötzchen geschieht in der Weise, daß man auf die Oberfläche des Klötzchens eine dickflüssige Celloidinschicht bringt, die Unterfläche des Celloidinblocks mit Aether befeuchtet und den Block in das Celloidin des Klötzchens eindrückt. Zur Härtung kommt das ganze noch für einige Stunden in 85-proz. Alkohol.

Man schneidet mit schräggestelltem Messer, das ebenso wie die Oberfläche des Blocks stets mit 85-proz. Alkohol befeuchtet sein muß. Die Schnitte werden in Alkohol vom gleichen Konzentrationsgrad aufgefangen.

F. Maiers[177] Methode der Herstellung von Celloidinserienschnitten:

Schneiden des Objektes und Uebertragen der Schnitte auf den sorgfältig gereinigten Objektträger in 75-proz. Alkohol. Festes An-

drücken der aufgelegten Schnitte an den Objektträger mit Filtrierpapier. Uebergießen der Serie mit einer Mischung von Nelkenöl (1 Teil) und absolutem Alkohol (9 Teile) $^1/_4$—$1^1/_2$ Minute. Vorsichtiges Abtropfenlassen des Oel-Alkohols, 1 Minute ruhig stehen lassen, Uebergießen der Serie mit absolutem Aether-Alkohol aa. Abdampfenlassen des Aether-Alkohols $^1/_4$—$^1/_2$ Minute. Uebergießen der Serie mit reinem Schwefelkohlenstoff 10—15 Minuten. Entfernung des Schwefelkohlenstoffs in 2mal zu wechselndem 96-proz. Alkohol 15—20 Minuten. Will man nun färben, so geht man in der üblichen Weise durch die Alkoholreihe herunter ins destillierte Wasser. Färbung, Differenzierung in der üblichen Weise.

Methode der Celloidin-Schnelleinbettung nach Scholz[262]: Stückchen von höchstens 3 mm Dicke kommen direkt in reines Aceton (die Stückchen können vorher auch in Formalin oder Alkohol gelegen haben) bleiben in der Wärme (Siedepunkt für Aceton 56°) $^1/_2$—1 Stunde. Aus dem Aceton, das nicht unbedingt erneuert zu werden

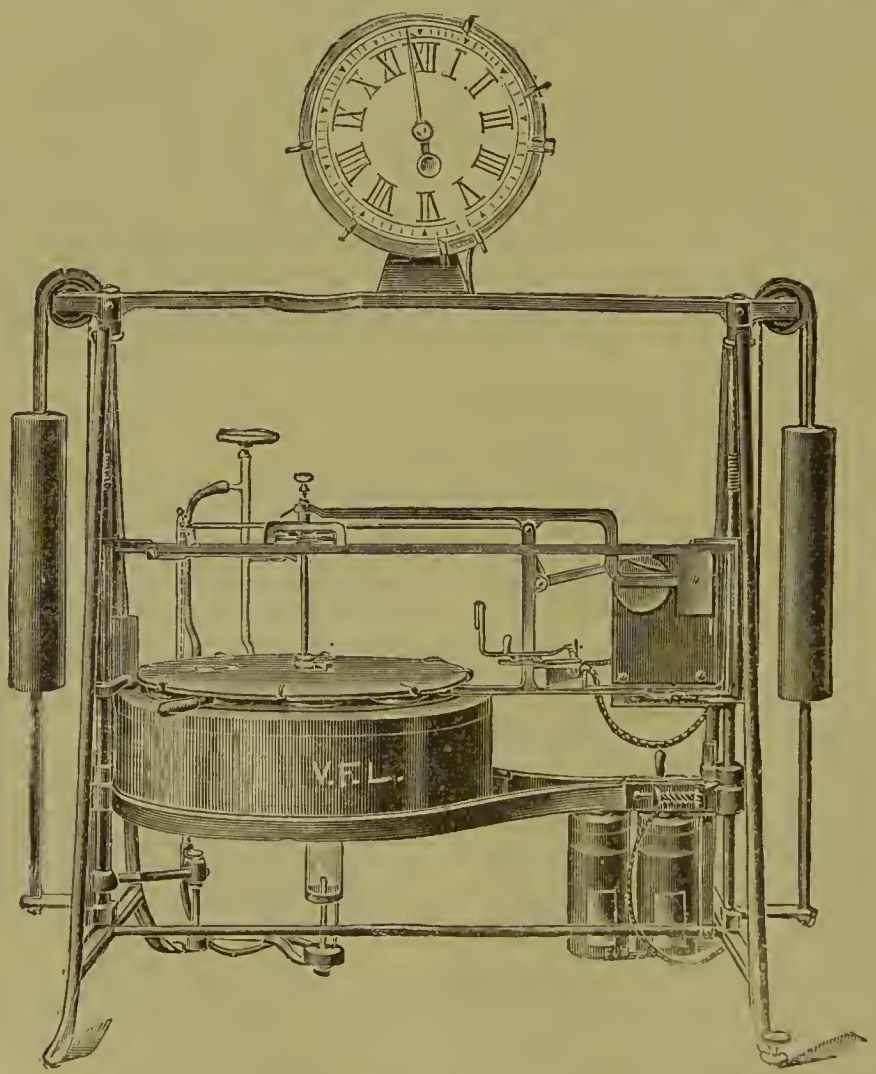


Fig. 34.

braucht, werden die Stückchen in den meisten Fällen direkt in dünnes Celloidin übertragen, für Auskratzungs- und ähnliche Produkte empfiehlt sich vorher ein 15 Minuten langer Aufenthalt in

Aether-Alkohol. In der dünnen Celloidinlösung bleibt das Material bei 37—40° 4—5 Stunden, dann wird etwas dickes Celloidin zugesetzt und die Stückchen nach weiteren 2—3 Stunden in dickes Celloidin ausgegossen. Ueber Chloroform werden sie dann 12—14 Stunden getrocknet und in verdünntem Alkohol noch einige Stunden nachgehärtet. Auch bei mit Flemmingscher Lösung vorbehandelten Organen gibt die Methode gute Resultate.

Arndt[4] gab einen Apparat zur selbsttätigen Fixierung und Einbettung an (Fig. 34). (Herstellung von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N.)

Die Apparatur besteht aus einem Wasserbad mit acht Oeffnungen für Gefäße zur Aufnahme der Tauchflüssigkeiten. Jede Oeffnung bildet ein kleines Erwärmungsbad für sich, dessen Temperatur innerhalb gewisser Grenzen durch Ventilationsschieber zu regulieren ist. Ueber diesem Wasserbad ist eine Platte drehbar angebracht, an deren Unterseite der Korb zur Aufnahme der Objekte hängt. Mit Hilfe eines durch elektrischen Impuls ausgelösten Uhrwerkes wird dieser Korb automatisch nach vorher an dem Zifferblatt einzustellenden Zeiträumen von einem Medium in das andere gebracht, zuletzt in das Paraffin. Nach vollendeter Einbettung hebt sich die den Korb tragende Platte automatisch aus dem Wasserbad heraus, eine zweite Platte verschließt das Wasserbad und das Präparat kann im Korbe erstarren. Die Zeiträume des Verweilens in jeder Flüssigkeit sind beliebig einstellbar, und zwar von 10 Minuten bis zu 12 Stunden. Paraffin-Schnelleinbettungen können in 40 Minuten bewerkstelligt werden.

IV. Das Schneiden erfolgt mit Hilfe des Mikrotoms. Man benutzt meist Schlittenmikrotome, von denen zwei Typen am gebräuchlichsten sind. Beim Jungschen Mikrotom (Fig. 35) geschieht die Hebung des Objekts auf schräg ansteigender Bahn durch einen „Objektschlitten", während das Messer des Mikrotoms sich horizontal in dem „Messerschlitten" bewegt.

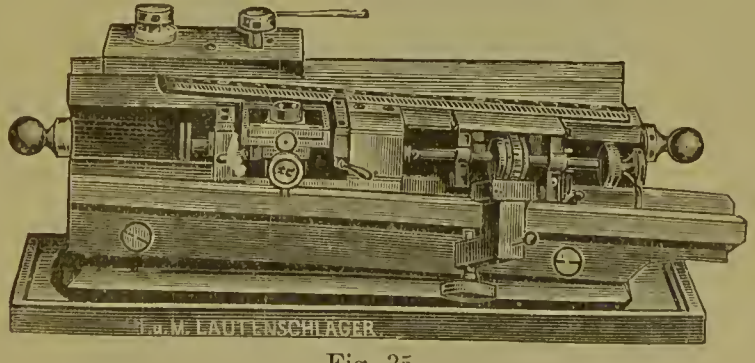


Fig. 35.

Das Schanzesche Mikrotom (Fig. 36) besitzt nur einen Messerschlitten, während die Hebung des Objektes durch eine Schraube erfolgt. Beim Vorschieben des Messers wird dann eine der Schraubenhebung entsprechende Lamelle vom Präparat abgeschnitten. Das Grundschlittenmikrotom von Leitz besitzt eine horizontale Gleitbahn, in der ein schwerer Schlitten mit dem Objekthalter bewegt wird. Die Mikrometerschraube wird durch Drehen eines Knopfes automatisch bewegt und kann von 1 μ an eingestellt werden. Das

Messer wird auf zwei Säulen eingeklemmt und ist zum Präparat feststehend.

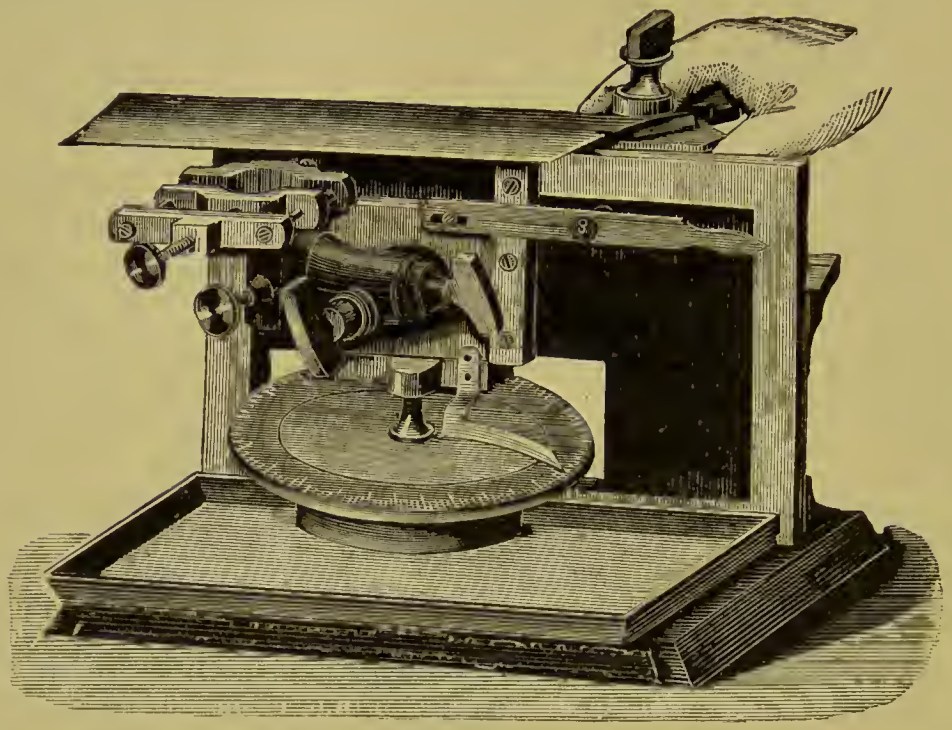


Fig. 36.

Bei dem Mikrotom Lebrun (Fig. 37), das gleichfalls für sehr feine Schnitte bestimmt ist, werden die zusammenhängenden Schnitte

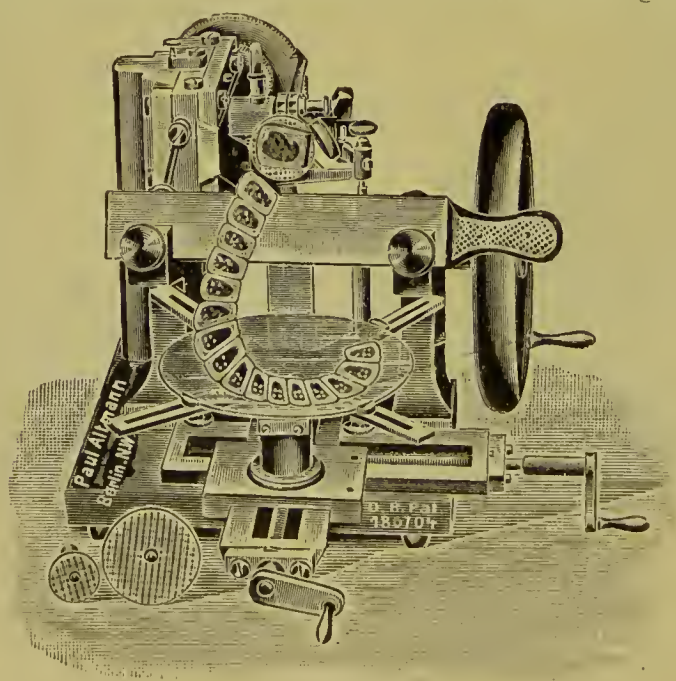


Fig. 37.

von dem unter dem Messer befindlichen runden Objektträger, der auf den vier Armen des Objekttisches steht, aufgenommen, wodurch

ganze Serien übersichtlich angeordnet gleichzeitig gefärbt werden können. —

Ein einfaches Mikrotom mit Gefriervorrichtung, das sich auch für Paraffin- und Celloidinschnitte eignet, ist im nebenstehenden abgebildet (Fig. 38). Es besitzt eine automatische Einstellung der Schnittdicke und mechanische Messerführung. Das Objekt steht bei diesem Mikrotom fest und das Messer wird am zu schneidenden Gegenstand vorbeigeführt.

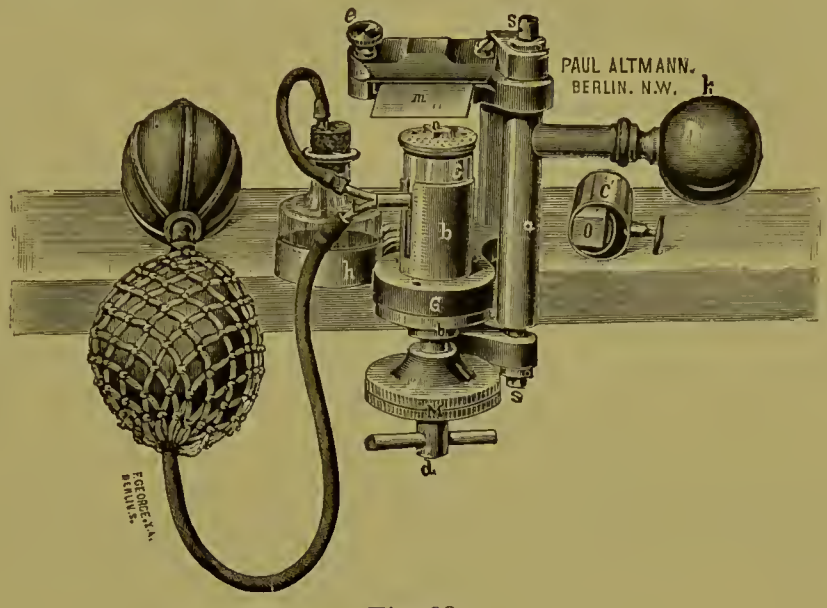


Fig. 38.

Die Befestigung des Präparates auf dem Objekthalter des Mikrotoms geschieht hier gleichfalls durch Gefrieren.

Bei den übrigen Mikrotomen wird das Präparat auf ein Kork- oder Holzklötzchen aufgeklebt. Das Aufkleben geschieht mit Gummi arabicum oder Glyzeringelatine. Rezept der Glyzeringelatine: 1 Teil Gelatine, 2 Teile Wasser, 4 Teile Glyzerin. Zur Härtung des Klebemittels kommen die aufgeklebten Stücke nochmals in absoluten Alkohol. Ist die Härtung erfolgt, so werden die Präparate aus dem Alkohol herausgenommen, leicht abgetrocknet und in den Objekthalter des Mikrotoms eingespannt.

Die Schnitte werden in Alkohol aufgefangen und darin bis zur Färbung konserviert.

V. Vorbereitung der Schnitte zur Färbung. Zur Färbung bedürfen die Schnitte je nach der vorhergehenden Präparation noch eine besondere Behandlung. Schnitte, die in Alkohol sich befinden, also Celloidinschnitte und Schnitte von nicht eingebetteten, mit Alkohol fixierten und gehärteten Organen, müssen vor der Färbung von Alkohol befreit werden, was durch Ausspülen in Wasser erreicht wird. Das Paraffin der Paraffinschnitte muß vollständig extrahiert werden. Das geschieht mit einem guten Lösungsmittel des Paraffins, dem Xylol, in das die Schnitte ca. 5 Minuten lang eingelegt werden. Das Xylol seinerseits wird durch ca. 5 Minuten lange Einwirkung von Alkohol entfernt, der Alkohol wird mit Wasser ausgewaschen.

Die Färbung.

Reinigung der Deckgläser und Objektträger. Neue Deckgläser und Objektträger werden vor Benutzung zur Reinigung mit Leinwandläppchen oder Fließpapier, das in eine Mischung von Alkohol und Aether āā, in Xylol oder in Benzin getaucht ist, abgerieben; auch einfaches Erhitzen über der Bunsenflamme ist zu empfehlen.

de Rossi[241] reinigt die Deckgläser, indem er sie zuerst mit Alkohol und Schwefelsäure behandelt, hierauf wieder in ein Gemisch von Alkohol und Benzin bringt, abtrocknet und wiederholt durch die Flamme zieht.

v. Winkler[312] erzielt eine Reinigung durch 1—2 Tage langes Einlegen in kalte konzentrierte Schwefelsäure und Kaliumbichromat-Lösung, gründliches Auswaschen, Trocknen und 30 Sekunden langes Ausglühen auf einem Glühpfännchen bei der Schmelztemperatur des Bleies.

Scheffer empfiehlt das folgende Verfahren, das ausgezeichnete Resultate liefert: Man taucht nach Reinigung mit Alkohol-Aether die Deckgläschen, indem man sie mit der Cornet-Pinzette faßt, in Kollodium. Nach dem Herausnehmen hat sich das Deckgläschen mit einer feinen Schicht Kollodium überzogen, an der jede vorher noch vorhandene Verunreinigung des Deckgläschens haften bleibt. Oeffnet man jetzt die Branchen der Pinzette, so blättert sich die Kollodiumschicht gleichzeitig von dem völlig sauberen Deckgläschen ab.

Gebrauchte Deckgläser oder Objektträger werden in Schwefelsäure gelegt, darauf mit Wasser gründlich gewaschen und mit starker Kalilauge oder Kaliumkarbonatlösung gekocht, wieder mit Wasser gespült und wie neue Deckgläser bzw. Objektträger weiterbehandelt.

Peppler[218] kocht $^1/_2$ Stunde in 4-proz. Kaliumpermanganatlösung, spült in Wasser, kocht wieder $^1/_2$ Stunde in verdünnter Salzlösung (1:4) und spült gründlich mit Wasser. Weiterbehandlung wie bei neuen Gläschen.

van Ermengem & Hinterberger[68] kochen wiederholt in einer Mischung gleicher Teile von 6-proz. Kaliumbichromat und 6-proz. Schwefelsäure. Es folgt Abspülen in Alkohol und Trocknen oder Aufbewahren in Alkohol.

Zettnow[317] kocht 10 Minuten in folgender Lösung: 200 g Kaliumbichromat werden in 2 l kochenden Wassers gelöst und 200 ccm Schwefelsäure zugesetzt. Nach dem Kochen wird 5 Minuten mit verdünnter Natronlauge gespült, das Kochen mit obiger Lösung und Spülen mit Natronlauge nochmals wiederholt, mit Wasser gründlich gewaschen, mit Alkohol gespült und geputzt.

Zur Färbung klemmt man das Deckglas oder den Objektträger mit der Schichtseite nach oben in eine Cornetsche Pinzette (Fig. 39) ein. Es sind das Pinzetten, die vermöge ihrer Federkraft selbsttätig die Deckgläser festhalten.

Man übergießt nunmehr das eingespannte Deckglas mit der Farblösung, spült diese nach genügend langer Einwirkung ($^1/_4$ bis 1 Minute genügt meistens) ab, trocknet das Präparat zwischen Fließpapier und bettet es als Dauerpräparat in Cedernöl oder Kanadabalsam ein. Man kann auch besonders bei längerer Färbedauer die Deckglaspräparate, statt sie in der Cornetschen Pinzette zu färben,

für die angegebene Zeit mit der Schichtseite nach unten in ein Schälchen mit der betreffenden Farblösung einlegen.

Soll die Färbung unter Erhitzen geschehen, so bedient man sich des Färbebades nach Krönig (Fig. 40), das aus einem mit einem Deckel versehenen, vernickelten Metallbad besteht und an einem langen Griff bequem über der Flamme gehalten werden kann.

Fig. 39.

Sollen mehrere Objektträger gleichzeitig gefärbt werden, empfiehlt sich der Gebrauch des Kempner-Rabinowitschschen Farbgestelles (Fig. 41). Eine darunter stehende Schale nimmt die ablaufende Farbflüssigkeit auf.

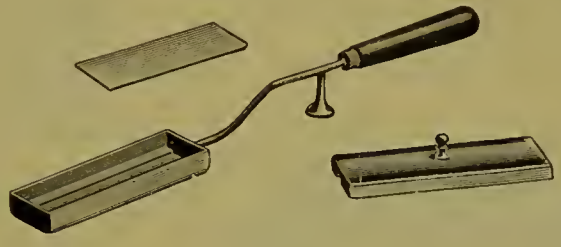


Fig. 40.

Ebenso für Massenfärbungen bestimmt ist das Farbgestell nach Flügge-Neisser (Fig. 42). Die Präparate liegen auf durchlochter

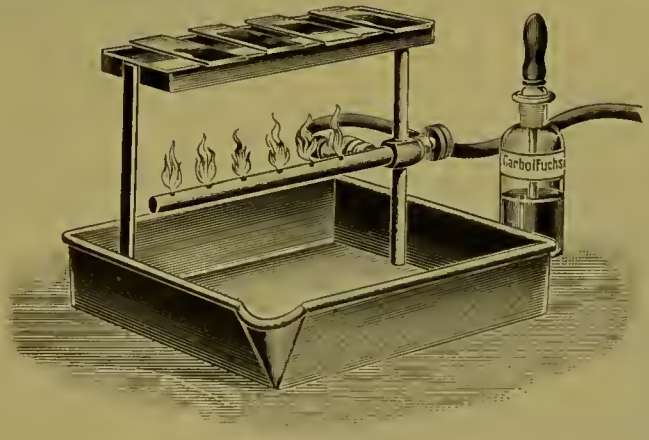


Fig. 41.

Gummiplatte, die überschüssige Farbe läuft in das darunter befindliche Blechgefäß, welches seitlich einen Abfluß mit Quetschhahn hat.

Am einfachsten kann man die gleichzeitige Färbung mehrerer Objektträgerpräparate so vornehmen, daß man sie auf zwei parallellaufende Glasstäbe legt, die ihrerseits über den Rändern einer Schale lagern, in die die überflüssige Farblösung ablaufen kann.

Fig. 42.

Zum Fixieren und Trocknen der Präparate dient zweckmäßig das ab-

gebildete Trockengestell (Fig. 43), das einen Metallrahmen mit kammartiger Leiste besitzt, worauf die Objektträger in schräger Lage ruhen.

Der Wärmeapparat nach Maassen (Fig. 44) ist am Stativ verstellbar und wird benutzt zum Erwärmen resp. Trocknen der Deckgläschen- und Objektträgerpräparate bei mikroskopischen Färbungen. Die Objektträgerpräparate können auch bei bestimmten Temperaturen in kleine Glaskästen, welche zur Aufnahme der Farbflüssigkeit dienen, eingesetzt werden.

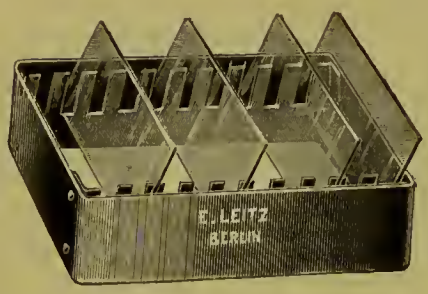


Fig. 43.

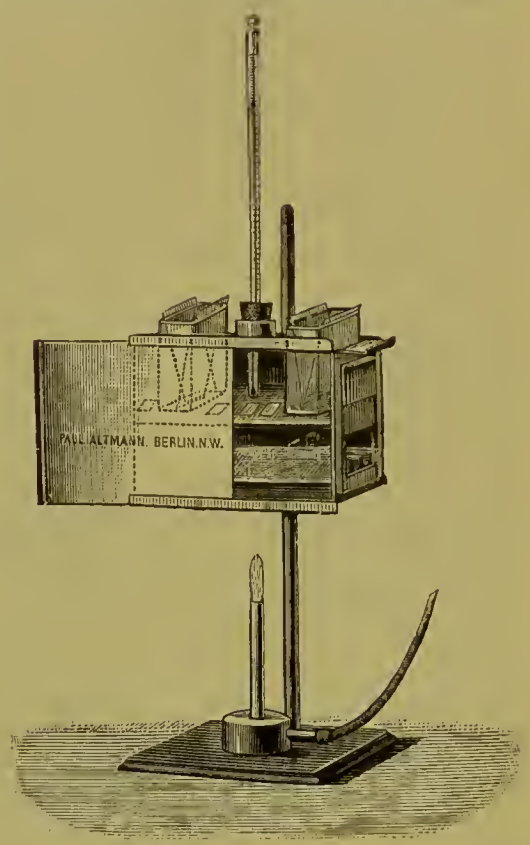


Fig. 44.

Zum Trocknen und Fixieren von Präparaten dient ferner der aus einer gebogenen Kupferheizplatte bestehende Heiztisch (Fig. 45) mit

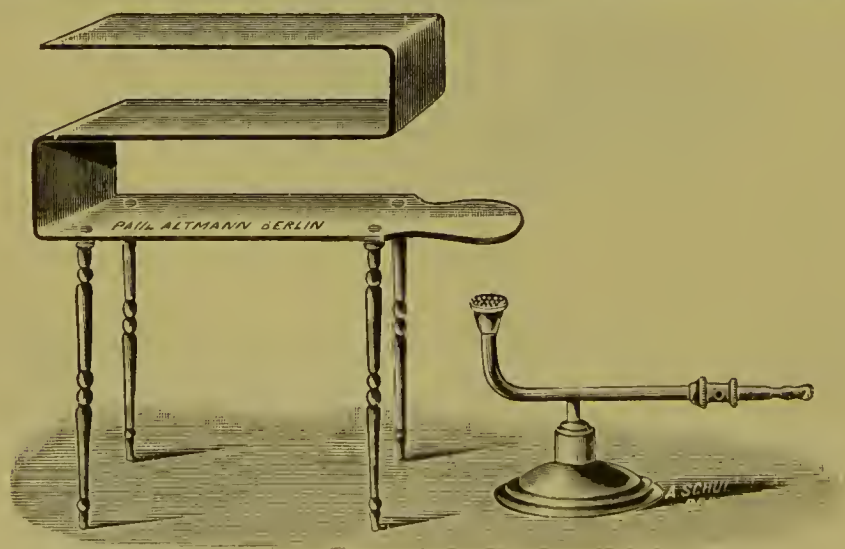


Fig. 45.

drei Etagen, durch die eine Variierung der Temperatur ermöglicht wird.

Die Färbung von Deckglaspräparaten und Gewebsschnitten.

Die Färbung und Differenzierung erfolgt nun nach den im vorhergehenden dargelegten Prinzipien.

Von den dort genannten Farben stellt man sich zunächst Lösungen in absolutem Alkohol her. Diese sind jedoch zur Färbung nicht geeignet. Sie dienen wegen ihrer guten Haltbarkeit als „Stammlösungen". Wäßrige konzentrierte Lösungen der meisten Farbstoffe zersetzen sich nämlich sehr leicht. Mit Hilfe der alkoholischen Lösungen stellt man sich die zum Färben zu verwendenden durch geeignete Verdünnung mit destilliertem Wasser her, etwa einen Teil Stammlösung auf 10 Teile Wasser.

Die einfache Färbung von Deckglaspräparaten und Schnitten.

Die einfache Färbung von Ausstrichpräparaten.

Die zur einfachen Färbung gebräuchlichsten Farbstoffe sind das Methylenblau und das Fuchsin. Fuchsin liefert dauerhafte und sehr intensive Färbung; Methylenblaupräparate blassen mit der Zeit ab. Trotzdem findet Methylenblau ausgedehnte Verwendung, weil man gerade mit ihm, da es zarter als Fuchsin färbt, Details im Bakterienleib deutlich zur Anschauung bringen kann. Auch überfärbt Methylenblau weniger den Grund, weshalb es besonders für Präparate von Eiter, Gewebssaft u. dgl. verwandt wird.

Einfache Färbung von Schnittpräparaten (Universalmethode) und Nachbehandlung der gefärbten Schnittpräparate im allgemeinen.

Da es sich bei Schnittpräparaten in jedem Falle um Darstellung verschiedener Elemente (Bakterien und Zellen) handelt, so schließt sich auch an die einfache Färbung stets eine Differenzierung an.

Ferner gestaltet sich das Einschließen der Schnitte in Cedernöl oder Balsam nach der Färbung etwas anders, als bei Deckglaspräparaten. Es sei dies Verfahren im voraus kurz besprochen. Da Oel resp. Balsam mit Wasser eine trübe Emulsion gibt, so müssen die Schnitte nach der Differenzierung, ehe sie eingeschlossen werden, vollständig vom Wasser befreit sein. Zu dem Zweck bringt man sie je 1—3 Minuten nacheinander zuerst in 70-proz., dann in 96-proz. und absoluten Alkohol. Bei manchen Methoden ist dies Verfahren nicht anwendbar, weil der Alkohol bekanntlich farbstoffentziehend wirkt. Kühne setzt, um diesen störenden Einfluß zu vermeiden, dem Alkohol eine geringe Menge des zur Färbung verwandten Farbstoffes zu. Für die bei der Alkoholbehandlung aus den Geweben diffundierenden Farbstoffpartikel treten dann andere in das Präparat ein.

Weigert ließ den Alkohol ganz weg und ersetzte ihn durch Anilinöl. Unna[293 u. 294] bringt speziell für Lepraschnitte das differenzierte Material in Wasser, aus dem es auf den Objektträger übertragen, mit Fließpapier abgetupft und dann über der Flamme getrocknet wird (Trockenmethode). Nach dem Entwässern werden die

Präparate in Xylol aufgehellt und in Cedernöl oder Kanadabalsam eingeschlossen. Es gestaltet sich danach die Methode der einfachen Schnittfärbung (Universalmethode) folgendermaßen:

Methode von Löffler[170–173].

1. Färbung in alkoholischer Methylenblaulösung, 3—5 Minuten, oder in verdünnter Karbolfuchsinlösung, je nach der Verdünnung verschieden lange.
2. Differenzierung in Wasser oder $^1/_2$-proz. Essigsäure.
3. Entwässern in Alkohol.
4. Aufhellen in Xylol, Einschließen.

Methode von Kühne[154–156].

1. Färben in einer Lösung von

1,5 Methylenblau,
10,0 Alkohol absol.,
100,0 5-proz. Karbolsäure.

2. Differenzierung mit 0,5-proz. Salzsäure.
3. Abspülen in Lösung von Lithionkarbonat (6—8 Tropfen konz. wäßriger Lösung auf 100 Wasser).
4. Wasserspülung.
5. Absoluter Alkohol, der mit Methylenblau leicht gefärbt ist, $^1/_2$ Minute.
6. Anilinöl mit Methylenblau (violette Lösung), einige Minuten.
7. Anilinöl.
8. Terpentinöl, Xylol, Einschließen.

Methode von Nicolle[209].

a)

1. Färbung mit alkal. Methylenblaulösung.
2. Differenzierung in $^1/_2$-proz. Essigsäure.
3. 10-proz. Tanninlösung einige Sekunden.
4. Wasserspülung, Entwässern, Aufhellen, Einschließen.

b)

1. Färbung mit folgender Mischung:

gesättigte alkoholische Thioninlösung	10,0
1-proz. Karbolsäure	100,0.

2. Wasserspülung, $^1/_2$—1 Minute.
3. Absoluter Alkohol, Aufhellen, Einschließen.

Methode von Zieler[319].

Zieler empfiehlt zur Schnittfärbung schwer färbbarer Bakterien (Rotzbac., Typhusbac., Gonok.) in der Haut folgende Methode:

1. Fixierung und Härtung beliebig, am besten Formol-Müller-Gemisch (1:9). Schneiden in Paraffin, Aufkleben der Schnitte (bei Celloidineinbettung Entfernung des Celloidins vor der Färbung).

2. Ueber Nacht (8—24 Stunden) Färbung in saurer Orceinlösung (Orcein D [Grübler] 0,1, Offizin. Salpetersäure [Ph. G.] 2,0, 70-proz. Alkohol 100,0).

3. Abspülen in 70-proz. Alkohol zur Entfernung des überschüssigen Orcein.

4. Wasserspülung.

5. 10 Minuten bis 2 Stunden Färbung in Unnas polychromem Methylenblau.

6. Aqua dest.

7. Gründliches Differenzieren in Glyzerinäthergemisch (1:2—5 Aqua) bis Schnitte hellblau und keine Farbwolken abgegeben werden.

8. Aqua dest.

9. 70-proz. Alkohol, Alcohol absolutus, Xylol, Balsam.

Spezielle Färbungsmethoden zur differenten Darstelluug von Teilen des Bakteriums.

Methoden der Kapselfärbung.

Die Darstellung der Bakterienkapsel gelingt in der Regel nur bei Material, das dem Tierkörper entstammt oder in einer tierischen Flüssigkeit gezüchtet ist (z. B. Milzbrand). Boni[37] konnte allerdings auch bei Bakterien aus Kulturen Kapseln darstellen, wenn er statt des destillierten Wassers bei der Färbung Bouillon, Körperflüssigkeit oder eine Mischung von einem Hühnereiweiß, 50 g Glyzerin und einige Tropfen Formalin verwandte.

Methode von Johne[135].

1. Färbung mit erwärmter 2-proz. wäßriger Lösung von Methylviolett oder Gentianaviolett, 1—2 Minuten.

2. Wasserspülung.

3. Entfärbung in 1—2-proz. Essigsäure, 10 Sekunden.

4. Wasserspülung.

5. Untersuchung in Wasser, nicht in Balsam!

Methode von Klett[141].

1. Färbung mit alkoholisch-wäßriger Methylenblaulösung 1:10:100 unter Erwärmen bis zum Aufkochen.

2. Wasserspülung.

3. Färbung mit Fuchsinlösung von gleicher Konzentration wie die Methylenblaulösung, 5 Sekunden.

4. Wasserspülung etc.

Methode von Friedländer[76,77].

Für Deckglaspräparate.

1. Behandeln der fixierten Deckglaspräparate mit 1-proz. Essigsäure, 2 Minuten.

2. Abspülen, Trocknen.

3. Färbung mit Anilinwassergentianaviolettlösung, einige Sekunden.

4. Wasserspülung, Trocknen, Einschließen in Kanadabalsam.

Für Schnitte.

1. Färbung in folgender Lösung, 24 Stunden bei 37°:
   konzentrierte alkoholische Gentianaviolettlösung 50,0,
   Eisessig 10,0,
   Aq. dest. 100,0.
2. Differenzierung in 1-proz. Essigsäure.
3. Wasserspülung, Entwässern etc.

Methode von Ribbert[234].

Für Deckglaspräparate.

1. Färbung in einer in der Wärme gesättigten Lösung von Dahlia in: Wasser 100,0, Alkohol 50,0, Eisessig 12,5, einige Minuten.
2. Wasserspülung, Trocknen, Einschließen in Balsam.

Methode von Vincent[298].

Für Deckglaspräparate von Blut.

1. Behandeln des Deckglaspräparates mit folgender Mischung (zur Entfernung des Hämoglobins):
   30,0 Glyzerin,
   30,0 kalte, gesättigte Kochsalzlösung,
   6,5 5-proz. Karbolsäure, 1—2 Minuten.
2. Wasserspülung.
3. Färbung in Lösung von Karbolmethylenblau und 1—2-proz. wäßriger Methylenblaulösung.
4. Wasserspülung, Untersuchung in Wasser.

Methode von Nicolle.

1. Färbung in folgender Mischung:
   Gesättigte alkoholische (95-proz.) Gentianaviolettlösung 10,0,
   1-proz. Karbolsäure 100,0.
2. Abspülen in absolutem Alkohol und $^1/_3$ Vol. Aceton.
3. Wasserspülung, Trocknung, Einbettung.

Methode von Kaufmann[138].

1. Vorfärbung mit Löfflerschem Methylenblau, mehrere Stunden unter öfterem Erhitzen oder im Brutschrank bei 35°.
2. Spülung in alkalisiertem Wasser (Zusatz von 1—2 Tropfen konzentrierter Lösung von Kali oder Natronlauge auf ein Uhrschälchen voll Wasser).
3. Trocknung.
4. Behandlung mit $^1/_2$-proz. Silberlösung, 2 Minuten.
5. Spülung in dem unter 2. angegebenen alkalisierten Wasser.
6. Nachfärbung mit alkoholisch-wäßriger Fuchsinlösung (1:20), 30 Sekunden.
7. Spülung mit alkalisiertem Wasser (cf. unter 2).
8. Trocknen etc.

Methode von Olt[214].

1. Färbung mit 2-proz. wäßriger, heiß bereiteter und filtrierter Safraninlösung unter mehrmaligem Erhitzen, $^1/_2$—1 Minute.

2. Wasserspülung und Untersuchung in Wasser (Kapsel färbt sich quittengelb, Bakterienleib rotbraun).

Methode von Weidenreich-Kayser-Hamm[105, 139, 302].

1. Einlegen des sauber gereinigten Glases in eine mit Osmiumdämpfen (Glaswatte mit 1-proz. Osmiumsäure) gefüllte Röhre, 1 bis 2 Minuten.
2. Herausnehmen und Ausstreichen des Präparates in einem Tröpfchen Serum.
3. Sofortiges Zurückbringen des belegten Glases in die Fixationsröhre für 20—40 Sekunden.
4. Lufttrocken werden lassen und färben mit Giemsascher Lösung (s. S. 356), ohne das Präparat durch die Flamme gezogen zu haben.

Methode von Buerger[45].

1. Mischen einer Spur Kultur mit einem Tropfen Serum (Mensch, Rind).
2. Nachdem der Ausstrich halbtrocken geworden, wird der Objektträger mit Müllerscher Flüssigkeit, die mit Sublimat gesättigt (5 bis 7-proz.), bedeckt.
3. 3 Sekunden langes Erwärmen, Wasserspülung.
4. Alkohol (80—95-proz.) einige Minuten.
5. Jodtinktur 1 Minute.
6. Abspülen mit Alkohol. — Lufttrocken werden lassen.
7. Färben mit Gentianaviolett 3 Sekunden, Auswaschen und Einschließen in 2-proz. Kochsalzlösung.

(Bei Dauerpräparaten muß das Salzwasser mit einer 5—10-proz. wäßrigen Lösung von Kal. ferrocyanatum abgespült werden. Trocknen. Kanadabalsam.)

Methode von Muirs (zit. nach Smith)[270].

1. Beizen des getrockneten Präparates 2 Minuten mit folgender Lösung: 2 Teile gesättigte, wäßrige Quecksilberchloridlösung, 2 Teile 20-proz. wäßrige Tanninlösung, 5 Teile wäßrige Kalium-Alaunlösung.
2. Wasserspülung.
3. Alkohol.
4. Wasserspülung.
5. Färben 2—3 Minuten unter leichtem Erwärmen mit Karbolfuchsin.
6. Wasserspülung.
7. Wiederholte Beizung, 2—3 Minuten.
8. Wasserspülung.
9. Färben mit gesättigter, wäßriger Methylenblaulösung, 2 Minuten.
10. Bleichen in Methylalkohol und Aufhellen in Xylol.

Methode von R. Hoffmann[123].

Zur Kapseldarstellung bei Streptokokken verfährt R. Hoffmann folgendermaßen: Ein möglichst dünner Ausstrich wird auf dem Glase getrocknet und auf 2 Minuten in eine 0,25-proz. methylalkoholische Lösung von eosinsaurem Methylenblau gebracht

(gebrauchsfertig bei Dr. Schwalm-München); Fixierung des Materials erübrigt sich. Hiernach Einlegen der Objektträger 1 Minute lang in (neutrales!) destilliertes Wasser, Trocknung durch Abtupfen mit Filtrierpapier.

Kapseldarstellung mit der Tuschemethode nach Gins[94].

1. Ausstreichen einer nadelkopfgroßen Menge von Kultur im Tuschetropfen (1:1 Wasser) mit der Schmalseite eines Objektträgers.
2. Fixieren des Ausstriches in konzentrierter Sublimatlösung, 1 Minute.
3. Wasserspülung.
4. Färben mit Karbolthionin, 5—10 Minuten.
5. Wasserspülung, Trocknen (Kapsel ungefärbt, Bakterienleib gefärbt in der Kapsel).

Methoden der Sporenfärbung.

Methode von Buchner[44].

1. Behandeln des fixierten Deckglases mit konz. Schwefelsäure, 30 Sekunden.
2. Nachfärben mit Karbolfuchsin. (Nur die Sporen färben sich.)

Methode von Hauser[110].

1. Färbung mit wäßriger Fuchsinlösung, indem das mit der Farblösung bedeckte Präparat 40—50mal durch die Flamme gezogen wird, eventuell unter Erneuerung der verdampfenden Farblösung.
2. Entfärbung in 25-proz. Schwefelsäure.
3. Wasserspülung.
4. Nachfärben mit wäßriger Methylenblaulösung.

Methode von Fiocca[72].

1. Färbung der Präparate 3—15 Minuten in einer Lösung von 20 ccm 10-proz. Ammoniak und 10—20 Tropfen alkoholischer Anilinfarbstofflösung.
2. Differenzierung in Schwefelsäure.
3. Wasserspülung.
4. Gegenfärbung mit verdünnter wäßriger Anilinfarbstofflösung.

Methode von Möller[190].

1. Behandeln des fixierten Deckglases mit Chloroform, 2 Minuten. (Unter der Chloroformeinwirkung lösen sich eventuell im Präparat vorhandene Fetttropfen, die durch ihre Färbung Sporen vortäuschen können.)
2. Wasserspülung.
3. 5-proz. Chromsäure, $1^1/_2$—2 Minuten.
4. Wasserspülung.
5. Färbung mit wäßriger Karbolfuchsinlösung unter Erwärmen, 1 Minute.
6. Entfärbung in 5-proz. Schwefelsäure, 5 Sekunden.
7. Wasserspülung.

8. Nachfärben mit wäßriger Lösung von Methylenblau, $^1/_2$ Minute.
9. Wasserspülung, Trocknen, Einschließen in Kanadabalsam.

Methode von Aujeszky[8a].

1. Einlegen der lufttrockenen, nicht fixierten Ausstriche in heiße $^1/_2$-proz. Salzsäure.
2. Wasserspülung.
3. Trocknen.
4. Fixieren.
5. Färben mit Anilinwasserfuchsin oder Karbolfuchsin 1 Minute unter Aufkochen.
6. Entfärben mit 5-proz. Schwefelsäure, 5 Sekunden.
7. Wasserspülung.
8. Färben mit Methylenblaulösung.
9. Wasserspülung usw.

Methode von Klein[140].

Ausgehend von der Vorstellung, daß die Farben besser vor der Fixation eindringen, färbte Klein sporenhaltiges Material vor der Fixation nach folgender Methode:

1. Zusatz eines gleichen Quantums Karbolfuchsinlösung zu einer Emulsion des sporenhaltigen Materials in Kochsalzlösung. Färbung 6 Minuten unter schwachem Erwärmen.
2. Aufstreichen auf Deckgläser, Lufttrocknung und Fixierung in der Flamme.
3. Entfärbung in 1-proz. Schwefelsäure, 1—2 Sekunden.
4. Wasserspülung.
5. Nachfärben mit verdünnter Methylenblaulösung, 3—4 Minuten.

(Nach dem Prinzip der Färbung von der Fixation lassen sich übrigens auch gewöhnliche Bakterien behandeln.)

Methode von Orzag[216].

1. Auf gründlich gereinigten Deckgläschen werden die zu färbenden Bakterien in einen Tropfen essigsaurer Natriumsalicyllösung ($^1/_2$-proz. Natr. salicyl. 4 Teile + 5-proz. Essigsäure 1 Teil) gebracht.
2. Fixieren des lufttrockenen Präparates in der Flamme.
3. Färbung mit Ziehlscher Lösung bis Dampf aufsteigt. Nach kurzer Pause wird die Färbung wiederholt.
4. Entfärben mit 1-proz. Schwefelsäure, Wasserspülung.
5. Nachfärben mit 1-proz. wäßrigem Methylenblau oder Malachitgrün, 2 Minuten.

Methode von Wirtz[313 u. 314].

1. Fixieren 10—20 Sekunden in Osmiumdämpfen.
2. Färben in 5-proz. Malachitgrünlösung unter Erhitzen bis zur Dampfbildung. Nach 1 Minute das Erhitzen wiederholen.
3. Mit 5-fach verdünnter Karbolfuchsinlösung abspülen. Wasserspülung.

Auch das Löfflersche und Bungesche Verfahren zur Darstellung der Geißeln (s. u.) kann zur Sporenfärbung verwandt werden.

Methode von Thesing[282].

1. Bedecken des durch die Flamme fixierten Präparats mit 1-proz. Platinchloridlösung, Erhitzen bis zum einmaligen Aufkochen.
2. Abspülen mit Wasser, Trocknen zwischen Fließpapier.
3. Karbolfuchsin unter einmaligem Aufkochen oder kalt, 5 Minuten.
4. Abgießen der Farblösung, ohne abzuspülen, Uebergießen mit 33-proz. Alkohol und sofortiges Abspülen mit Leitungswasser.
5. Trocknen, Kontrastfarbe (Löfflers Methylenblau), Abspülen, Trocknen, Einschluß in Balsam.

Methode von Trincas[284].

1. Mazeration in 5-proz. Chromsäure (einige Minuten).
2. Kochen in karbolsaurem Fuchsin.
3. Wasserspülung.
4. Entfärbung mit unterchlorsaurem Kalk (10 Proz.).
5. Wasserspülung.
6. Einlegen in 40-proz. Formalinlösung (einige Sekunden).
7. Wasserspülung.
8. Färben mit Chrysoidinlösung (1:30). (Die Sporen werden rotbraun, die Bacillen gelb.)

Methoden der Geißelfärbung.

Zur Färbung eignen sich am besten junge, auf nicht zu alten Nährböden gewachsene Agarkulturen. Notwendige Vorbedingungen für das Gelingen der Präparate sind ferner: Herstellung einer stark verdünnten Emulsion und Ausstreichen auf absolut reinen, vor allem fettfreien Deckgläsern.

Methode von Löffler[170–173].

1. Beizen mit folgender Mischung unter leichter Erwärmung, $^1/_2$—1 Minute.

20-proz. wäßrige Tanninlösung (in der Hitze bereitet)	100,0,
Kalt gesättigte Ferrosulfatlösung	50,0,
Alkoholische resp. wäßrige Fuchsinlösung	10,0.

2. Gründliche Entfernung der Beize durch Wasserspülung.
3. Abspülen mit Alkohol.
4. Färbung mit erwärmter Anilinwasserfuchsinlösung, die durch Zusatz von Natronlauge im Zustand der „Schwebefällung" sich befindet.
5. Wasserspülung, Trocknung, Einbettung.

(Die Lösung in dem für die Beize angegebenen Rezept ist nicht für alle Bakterienarten geeignet, sie benötigt vielmehr in der Regel noch einen je nach der zu färbenden Bakterienart verschiedenen Zusatz von Säure resp. Alkali.)

Methode von Bunge[46].

Dieselbe stellt eine Modifikation der Löfflerschen Methode dar.

1. Beizen mit folgender Mischung unter Erwärmen, 1—5 Minuten.

75,0 konz. wäßrige Tanninlösung,
25,0 5-proz. Lösung von Liquor ferri sesquichlorati,
10,0 konz. wäßrige Fuchsinlösung.

Die Beize ist erst einige Tage nach der Bereitung gebrauchsfähig und wird vor dem Gebrauch bis zur rotbraunen Färbung mit Wasserstoffsuperoxyd versetzt.

2. Wasserspülung.
3. Färbung mit erwärmter Karbolgentianaviolettlösung.
4. Wasserspülen usw.

Methode von van Ermengem[68].

1. Beizen mit folgender Mischung 5 Minuten unter Erwärmen oder $^1/_2$ Stunde in der Kälte:

60,0 ccm 20-proz. Tanninlösung,
30,0 ccm 2-proz. Osmiumsäure,
4—5 Tropfen Eisessig.

2. Wasserspülung.
3. Alkoholspülung.
4. Eintauchen in 0,5—1-proz. Lösung von Argentum nitricum, 1—3 Sekunden.
5. Abspülen in folgender Lösung für einige Sekunden:

Acid. gallic.	5,0,
Acid. tannic.	3,0,
Natr. acetic.	10,0,
Aqu. dest.	350,0.

6. Behandeln mit der unter 4. erwähnten Silberlösung unter häufigem Hin- und Herbewegen des Präparates, bis die Lösung sich schwärzt.
7. Wasserspülen, Trocknen usw.

Stephensen[54] verwendet bei der van Ermengemschen Geißelfärbung statt Silberlösung eine 2-proz. Larginlösung mit gutem Erfolg.

Methode von Welcke[309a].

1. Fixieren der sorgfältig ausgestrichenen lufttrockenen Präparate in der Flamme.
2. 20 Minuten kalt beizen mit Löfflers oder Bunges Beize.
3. Wasserspülung.
4. Behandlung mit Silberoxydammoniaklösung unter Erwärmen bis zur Dampfbildung und Bräunung des Präparates.
5. Wasserspülung.
6. Eintauchen in 1-proz. Sublimatlösung, 15 Sekunden, Wasserspülung.
7. Behandlung mit Silberoxydammoniaklösung bis zur leichten Bräunung des Präparates. Wasserspülung.
8. Behandlung mit Rodinal- oder Metolentwickler, 15 Sekunden. Wasserspülung. Trocknung.

(Bei leicht darzustellenden Arten kann direkt nach der Sublimateinwirkung die Entwicklung erfolgen.)

Methode von Zettnow[317].

1. Beizen der Deckglaspräparate unter Erwärmen auf einer Metallplatte (80°) im Blockschälchen in einer Lösung, die folgendermaßen bereitet wird:

Zu einer 5-proz. leicht erwärmten Tanninlösung wird soviel von einer Brechweinsteinlösung zugesetzt, bis ein dauernder Niederschlag entsteht. Danach Filtration.

2. Behandeln mit folgender Silberlösung unter Erwärmen:

Verdünnung einer gesättigten Lösung von Silbersulfat (aus Silbernitrat durch Zusatz von Magnesiumsulfat oder Natriumsulfat dargestellt) zur Hälfte mit Wasser und Zusatz einer 30-proz. Lösung von Aethylamin bis zur völligen Lösung eines anfänglich aufgetretenen Niederschlags. Abermalige Hinzufügung von Silbersulfat bis zur beginnenden Niederschlagsbildung.

3. Wasserspülung.

4. Verstärken mit einer Lösung von Aurum chloratum neutrale 1:2000 oder mit Sublimat 1:10.

5. Wasserspülung.

6. Behandeln des Deckglases mit einer Mischung von 2 Tropfen 2-proz. Sodalösung und 1—2 Tropfen einer Lösung von 1 g Pyrogallol in 20 ccm Alkohol + 2 Tropfen Eisessig.

7. Wasserspülung usw.

Statt durch die Silberlösung (cf. unter 2) lassen sich die Geißeln auch mittels Gold wie folgt sichtbar machen:

Behandlung des gebeizten Präparats mit Aurum chloratum neutrale 1:2000 unter Erwärmung bis zur Dampfbildung.

Verstärken mit einer Mischung von 1 Tropfen einer 1-proz. Silbernitratlösung + 4 Tropfen folgender Lösung:

Wasser	150,0,
Zitronensäure	2,0,
Pyrogallol	0,5.

Zusatz von etwas Thymol gegen Schimmelbildung.

Die Mischung soll 2mal nacheinander je eine Minute einwirken.

Methode von Peppler[218].

1. Beizen mit folgender Mischung (4—6 Tage alt), 1—2 Minuten:

20 g Tannin
80 ccm Wasser } in der Wärme gelöst,

2. Wasserspülung.

3. Färbung mit Anilinfarbstofflösung (10 ccm konz. Alkohol, Farblösung, 2,5 Acid. carbolic. ad 100 Wasser), 2 Minuten.

4. Wasserspülung.

(5. Nachbehandlung mit Jodjodkaliumlösung, 1 Minute.)

6. Wasserspülung usw.

Methode von Smith[270].

1. Beizen mit folgender Lösung unter Erwärmen bis zur Dampfbildung, 3 Minuten lang:

Heiße, gesättigte Lösung von Sublimat wird mit Ammoniakalaun im Ueberschuß versetzt. Zu 10 ccm dieser Flüssigkeit Zusatz von 10 ccm einer frisch bereiteten 10-proz. Tanninlösung und 5 ccm Karbolfuchsin. Filtrieren.

2. Wasserspülung.

3. Färben 3—4 Minuten unter Erhitzen mit folgender Mischung: 10 ccm gesättigte Ammoniakalaunlösung, 1 ccm alkoholische Gentianaviolettlösung.

4. Wasserspülung usw.

Methode von Plaut[224 u. 225].

Als Beize wird Osmiumtanninlösung verwendet: 2-proz. Osmiumsäure, 1,25-proz. Tanninlösung mit 2 Teilen Eisessig — als Silbermittel das Aethylaminsilber. Gegen zuviel Niederschläge wird eine bis 1 Proz. starke Goldlösung verwendet, auch können die Ausstriche mit Jodjodkaliumlösung vorbehandelt werden.

Methode von Gemelli[85].

Die gereinigten Deckgläser werden in einer Mischung von 3-proz. Kaliumbichromat und Schwefelsäurelösung (100:5) gekocht und kommen nach reichlicher Wasserspülung in Alkohol, wo sie bis zur Verwendung liegen bleiben. Vor dem Gebrauch mit einer Hornpinzette durch die Flamme zu ziehen. Die Färbung geschieht mit folgenden zwei Lösungen:

a) Kalium permanganat. 0,25,
Aqua dest. 100,0.

b) Zu einer Chlorcalciumlösung (0,75 g in Aqu. dest. 100 g) im Verhältnis von 20:1 wird eine 1-proz. Neutralrotlösung (Grübler) in Aqu. dest. hinzugefügt.

Färbung: 1. 10—20 Minuten in a.
2. Waschen in Aqu. dest.
3. 15—30 Minuten in b.
4. Waschen, Trocknen, Einlegen.

Moores Geißelfärbung (zit. nach Smith)[270].

Nachdem man das Material auf dem Deckglas dadurch befestigt, daß man es 5—10 Minuten lang einer Temperatur von 120—140 Grad aussetzt, bringt man es 1) in folgender Beize: 10 ccm 20-proz. Tanninlösung, 5 ccm kalte gesättigte wäßrige Eisensulfatlösung, 1 ccm gesättigte alkoholische Lösung von basischem Fuchsin.

2. Erhitzen bis zur Dampfentwickelung und 5—10 Minuten lang in der heißen Flüssigkeit lassen.

3. Wasserspülung.

4. Färben mit Ziehls Karbolfuchsin unter 1—3 Minuten langem Erhitzen bis zur Dampfbildung.

Methode von Hugh Williams (zit. nach Smith)[270].

1. Man beizt ca. 1 Minute lang mit folgender Beize: 1 Teil 1-proz. Alumnollösung (Höchst), 1 Teil 2-proz. Osmiumsäure, 3 Teile 20-proz. Tanninlösung. Nach Schütteln der Mischung Hinzufügen von 3 Tropfen Eisessig und wieder Schütteln.

Man beizt ca. 1 Minute lang mit folgender Beize:

1. 1 Teil 1-proz. Alumnollösung (Höchst), 1 Teil 2-proz. Osmiumsäure, 3 Teile 20-proz. Tanninlösung. Nach Schütteln der Mischung Hinzufügen von 3 Tropfen Eisessig und wieder Schütteln.

2. Bedecken des Objektes mit 1-proz. Silbernitratlösung, der einige Tropfen Ammoniakwasser zugesetzt worden sind.

3. Wasserspülung.

4. Waschen mit 0,6-proz. Chlornatriumlösung, mit 30-proz. Ammoniakwasser, dann mit Wasser.

5. Verstärkung der Imprägnation durch Zugabe einiger Tropfen photographischen Entwicklers Ortol.

6. Wasserspülung und einige Sekunden mit 1-proz. Chlorgoldlösung bedecken. Dieses wird 3mal wiederholt. Der Verlauf der Färbung muß nach jedesmaligem Behandeln mit Chlorgold mikroskopisch kontrolliert werden.

Methode von de Rossi[241].

Reinigen der Deckgläser s. oben.

Färbung der unfixierten Präparate in folgender Mischung:

Lösung a: 50 g reinster kristallisierter Karbolsäure in 1 Liter destillierten Wassers gelöst, Zusatz 40 g reinsten Tannins, Erwärmen auf dem Wasserbade bis zur völligen Lösung.

Lösung b: Basisches Fuchsin (Rosanilinchlorhydrat) 2,5 g, absoluter Alkohol 100 ccm.

Lösung c: Kaliumhydrat 1 g, destilliertes Wasser 100 g.

Lösung a u. b werden zusammengemischt aufbewahrt. Zur Färbung setzt man zu etwa 15—20 ccm der a- und b-Mischung tropfenweise so viel der c-Lösung, bis ein bleibender Niederschlag sich zu bilden beginnt. — Filtration bis die Flüssigkeit absolut klar bleibt. — Aufgießen der filtrierten Flüssigkeit auf die mit der Schichtseite nach oben auf einer Glas- oder Pappplatte liegenden Deckgläser und Färben, bis sich ein sichtbarer Niederschlag bildet. Wasserspülung und Trocknen mit Fließpapier.

Methode von Valenti[295].

1. Die gereinigten Deckgläschen werden mit der verdünnten Bakterienemulsion, welche 20—30 Minuten ruhig gestanden hat, beschickt.

2. Trocknen im Exsikkator.

3. Aufgießen von 2—3 Tropfen einer 20-proz. Lösung chemisch reiner Gerbsäure in gekochtem destillierten Wasser.

4. Färben des noch feuchten Deckglases mit 3 Tropfen Ziehlscher Lösung unter leichtem Erwärmen über einer Sparflamme 10—12 Sekunden.

5. Abkühlen und die Erwärmung noch 2—3-mal wiederholen.

6. Vorsichtiges Abspülen mit ganz dünnem Wasserstrahl.

7. Abtrocknen mit Filtrierpapier, Kanadabalsam.

Kral[148] empfiehlt zur Geißelfärbung alte, in luftdicht verschlossenen Gefäßen aufbewahrte Löfflersche Beize.

1. Einwirkenlassen $1^1/_2$ Minuten.

2. Färben 5—8 Minuten Ziehlsche Lösung.

(Sofort wirksam ist eine Tanninfuchsinlösung von 100 g Tannin, 8 g kristalliertes Fuchsin, 400 ccm Aqua, hierzu wird bei Gebrauch unter lebhaftem Schwenken zugesetzt eine Lösung von 5 g Ferrosulfat auf 20 ccm Wasser. Nach 15 Minuten Stehen ist die Beize brauchbar, sie ist weniger wirksam schon nach 2 Stunden, nicht mehr nach 24 Stunden. Gebeizt wird $1^1/_2$ Minuten, darauf 8 Minuten Karbolfuchsin.)

Hill[122] empfiehlt, um eine gute Geißelfärbung zu erhalten, die betreffenden Bouillonkulturen zu zentrifugieren, zu dekantieren, Wasser aufzugießen, und dieses Verfahren einige Male zu wiederholen,

um die Bakterien möglichst von der Nährbouillon zu befreien. Ein Loslösen der Geißeln vom Bakterienleib wird dabei nicht beobachtet.

Färbung der Bakterienstruktur (Babes-Ernstsche Körperchen usw.).
(siehe auch vitale Färbung).

Alte Methode von M. Neisser[203].

1. Färben mit folgender Lösung 1—3 Sekunden (oder länger):
   1,0 Methylenblau,
   20,0 Alkohol abs.,
   50,0 Eisessig ad 1000 Wasser.
2. Wasserspülung.
3. Nachfärben mit Vesuvin (2-proz. wäßr. Lösung), 3—5 Sekunden.
4. Wasserspülung u. s. w.

Methode von M. Neisser[204].

1. Färben mit einer Mischung 2:1 folgender Lösungen:
   Lösung a:
   Methylenblaupulver (Meth. medicale Höchst) 1,0,
   Alkohol absol. 20,0,
   Aq. dest. 1000,0,
   Acid. acet. glac. 50,0,
   Lösung b:
   Alkohol absol. 10,0,
   Aq. dest. 300,0,
   mehrere Sekunden.
2. Wasserspülung.
3. Nachfärben mit Chrysoidin (2 in 300 dest. Wasser 100° gelöst und filtriert) 3 Sekunden.
4. Wasserspülung.

Methode von Sommerfeld[272].

1. Färben mit Methylenblau (Löffler, alkoholisch oder wäßrig).
2. Abspülen mit Wasser oder Abtrocknen mit Fließpapier.
3. Einlegen in eine Mischung Formalin-Alkohol āā einige Sek. bis Präparat farblos geworden.
4. Wasserspülung, Trocknen.
5. Nachfärben in Vesuvin oder Chrysoidin oder Eosin.

Methode von Ljubinsky (zit. nach Blumenthal & Lipskerow[34]).

1. Färben $^1/_2$—2 Min. in:
   Pyoktanin Merck 0,25,
   Acid. acet. 5 Proz. 100,0.
2. Wasserspülung.
3. Nachfärben $^1/_2$ Min. mit 1 prom. Vesuvin.

Methode von Falière (zit. nach Blumenthal & Lipskerow[34]).

1. Färben $^1/_2$—1 Min. in:
   Methylenblau 2,0,
   Borax 0,5,
   Aqua dest. 100,0,
   Alk. abs. gtt. 8.

2. Wasserspülung.
3. Nachfärben in 1-prom. Vesuvin.

Methode von Trincas[284].

1. Färben 1 Minute in folgender Lösung:

Toluidinblau	0,25,
Alkohol	5,0,
Essigsäure, 2-proz.	100,0.

2. Ohne die Präparate auszuwaschen, 1 Minute in 1-proz. Vesuvinlösung. (Die metachromatischen Körnchen erscheinen schwarzblau, die anderen Teile der Zelle blaßgrün.)

Methode von Piorkowski[222].

1. Färben mit alkalischer Methylenblaulösung unter leichtem Erwärmen, $^1/_2$—1 Minute.
2. Entfärben mit 3-proz. salzsaurem Alkohol, 5 Sekunden.
(3. Nachfärben mit 1-proz. wäßriger Eosinlösung.)
4. Wasserspülen usw.

Methode von Löffler[170—173].

1. Färben ohne Erwärmen in folgender Mischung:

Wäßriger Borax (2,5-proz.)-, Methylenblau (1-proz.)-Lösung	40,0,
Polychromes Methylenblau Unna (von Grübler-Leipzig)	10,0,
0,05-proz. wäßr. Bromeosin extra A. G. (Höchst)-Lösung	50,0.

2. Entfärben mit Tropaeolin 00 (gesättigte wäßrige Lösung) 5,0,

Acid. acet.	0,5,
Aqua dest.	100,0.

Methode von Pitfield (zit. nach Blumenthal & Lipskerow[34]).

1. Aufgießen einer Mischung von Argent. nitr. 5 ccm, Aqua dest. 5 ccm, gesättigte alkoholische Fuchsinlösung 3 ccm und Erhitzen bis zum Kochen.
2. Wasserspülung.
3. Aufgießen einer Mischung von Acid. pyrogall. 1,0, 10-proz. Natronlauge 5 ccm, Aqua dest. 10 ccm und Erhitzen bis zum Kochen.
4. 2 Minuten langes Einwirkenlassen von folgender Karbolfuchsinlösung: 10 Tropfen Karbolfuchsin, Aqua dest. 10 ccm.
5. Abspülen mit Wasser, Trocknen etc. (Die Farbe der Bakterien ist rot, wobei die Polkörner schwarz hervortreten.)

Methode von Ficker[71].

Farblösung: 1 g Methylenblau (med. pur. Höchst) in 100 ccm dest. Wasser, hiervon 1 ccm zu 100 ccm dest. Wasser; zu 100 ccm dieser Lösung (1:10000) werden 2 ccm reine Milchsäure zugesetzt.

Färbung: Eine Spur Bakterienmaterial wird in einer Oese Leitungswasser auf dem Objektträger leicht verrieben und darauf ein reines Deckglas gelegt. Seitwärts in etwa 1 ccm Entfernung wird ein Tropfen der Farblösung gebracht und mit der Platinöse zum Deckglasrand hingeleitet. Vermittels eines an dem gegenüber-

liegenden Rande des Deckglases gehaltenen Stückchens Fließpapier wird die Farbe unter dem Deckglas dorthin abgesaugt und diese Prozedur 4—6-mal wiederholt. Auf diese Weise erreicht man eine isolierte Färbung der Körnchen. (Für die praktische Diphtheriediagnose empfiehlt sich die Methode jedoch nach Ficker nicht, da auch Pseudodiphtheriebacillen Granulafärbung zeigen.)

Eisenberg[63—65] färbt mit Manson-Blau. Auch in schon mit Ziehl vorbehandelten Tuberkelbacillenpräparaten lassen sich durch Nachbehandlung mit dieser Farblösung die Körnchen darstellen.

v. Wendt[310] will feinere Strukturverhältnisse im Bakterienkörper durch Vermeidung des Trocknens der Präparate darstellen. Hierzu bereitet er sich zunächst eine Bakteriensuspension in Wasser oder einem Fixierungsmittel (1—3-proz. Salpetersäure, $^1/_2$—3-proz. Sublimat etc.), bestreicht ein Deckgläschen mit einer ganz feinen Schicht von Mayers Eiweißglyzerin, gibt auf die Eiweißglyzerinschicht einige Tropfen Wasser und in diese etwas von der Bakteriensuspension. Mit einem Uhrglas bedeckt, läßt er die Bakterien in dem Wassertropfen sedimentieren (20—30 Min.), gibt dann noch einige Tropfen Wasser hinzu und fixiert jetzt die Bakterien auf der Glyzerineiweißschicht, indem er das Ganze auf 8—10 Minuten in einen Brutofen bei 75° stellt.

Meyer[185 u. 186] wendet zur Darstellung des Zellkernes der Bakterien folgende 3 Verfahren an:

1. Verfahren. — Das Material wird im Reagenzglas 2 Minuten mit Wasser gekocht, in ein Spitzgläschen gegeben und zentrifugiert. Nach Entfernung des Wassers wird zum Bodensatz etwas schwefelsaures Eisenoxydammoniak ($^1/_2$ g auf 100 ccm) gegeben, zentrifugiert, die Flüssigkeit abgehaben und zum Sediment Hämatoxylinlösung (1 : 200) gesetzt. Nach 24 Stunden wird wieder zentrifugiert, und die Bakterien wieder unter dem Deckglas entfärbt. (Cytoplasma und Sporenanlage entfärben sich, der Kern der Sporenanlage tritt deutlich hervor; meist ist er in der Mitte von einem hellen Hof umgeben.)

2. Verfahren. — Das zentrifugierte Material wird drei Stunden lang mit Flemmingscher Lösung (1 : 1) behandelt, mit Wasser auf der Zentrifuge sechsmal gewaschen, dann Alkohol innerhalb 2—3 Tagen tropfenweise zugesetzt. Zur Färbung wird verdünntes (1 : 1) Delafieldsches Hämatoxylin zugegeben, das nach 24 Stunden wieder abgeschleudert wird. Differenzierung mit 10 ccm 10-proz. Alkohol plus drei Tropfen 1-proz. Salzsäurealkohol. (Die Kerne in den Sporenanlagen treten gut hervor als scharf umschriebene dunkle Punkte in einer helleren kreisrunden Scheibe. Das Cytoplasma wird hellblau, die Membranen etwas dunkler blau.)

3. Verfahren. — Vorbehandlung wie oben beim zweiten Verfahren; dann wird Eisenlösung auf 24 Stunden zugesetzt, Zentrifugieren, Abhebern der Eisenlösung und Zusetzen von Hämatoxylin (24 Stunden). Nach abermaligem Zentrifugieren werden die Objekte unter dem Deckglas mit Eisenlösung differenziert.

Zur Darstellung von Fettsubstanzen verfährt Meyer in folgender Weise: Er verrührt ein Tröpfchen einer 1-proz. Lösung von Dimethylparamethylendiamin auf dem Objektträger mit einer Spur des Bakterienmaterials und fügt einige Oesen einer Lösung von α-Naphthol in 1-proz. Sodalösung hinzu.

Färbung des Chromatins nach Romanowsky.

In alter, besonders aber in mit Alkali versetzter Methylenblaulösung bilden sich Zersetzungsprodukte, die zum Teil für die histologische Technik von hohem Interesse sind. Nocht[211] gelang es mit Chloroform aus alkalischen Methylenblaulösungen einen roten Farbstoff auszuziehen, den er „Rot aus Methylenblau" nannte. Er entsteht durch Oxydation.

Die Gegenwart dieses Farbstoffs ist für die Chromatinfärbung, die besonders für Protozoen von Interesse ist, wichtig. Nach Nocht bedarf es zum Zustandekommen dieser Farbenreaktion noch des reinen Methylenblaus und des Eosins, während Michaelis[187] dem von Nocht sogenannten Rot aus Methylenblau, dem „Methylenazur" allein, die chromatinfärbende Fähigkeit vindiziert. Das Eosin soll nur eine begünstigende Wirkung haben.

Nach Reuter[232 u. 233] ist das wirksame Prinzip nicht der Methylenazur, sondern ein anderes nahestehendes Zersetzungsprodukt, das er „A-Methylenblau" nennt.

Da die gleichzeitige Anwesenheit von Methylenblau im Ueberschuß oder von Gentianaviolett die Chromatinfärbung beeinträchtigt, bemühte sich Giemsa das Methylenazur rein darzustellen, was ihm in seinem Azur I und Azur II gelang. Eine Vereinigung von Azur II mit Azur II-Eosin in Glyzerin und Methylalkohol gelöst, ist unter dem Namen „Giemsalösung für die Romanowskyfärbung" bei Dr. G. Grübler & Co. Leipzig zu beziehen. Vor dem Gebrauch wird die Lösung entweder mit gleichen Teilen reinem Methylalkohol oder reinem Aceton vermischt oder 1 Tropfen mit 1 ccm Aqua dest. verdünnt.

Methode von Ziemann[320].

1. Färbung der Präparate in folgender Mischung, 30—40 Minuten:
   1 Teil 1-proz. Lösung von Methylenblau med. pur. Höchst,
   6 Teile 0,1-proz. Eosinlösung AG oder BA Höchst.

Durch Zusatz von 2—4 Teilen Borax zur Methylenblaulösung wird deren Wirksamkeit erhöht. Man nimmt alsdann zur Mischung 4 Teile Eosinlösung. Färbedauer in diesem Fall 8—10 Minuten.

2. Event. Differenzierung mit dünner Eosin- bezw. Methylenblaulösung.
3. Wasserspülung usw.

Methode von Harris[107].

1. Fixieren einige Sekunden in Reuters Formalin-Alkohol.
2. Wasserspülung.
3. Färben mit Grüblers wasserlöslichem Eosin 1:1000, $^1/_2$—2 Minuten.
4. Wasserspülung.
5. Färben in folgender Lösung: 2,5—5 Teile 1-proz. Unnas alk. Methylenblaulösung, und 2,5 Teile einer 1-proz. Methylenblaulösung, 5—30 Minuten.
6. Wasserspülung. Trocknen. Balsam.

Methode von Nocht[211].

Färbung in folgender Mischung, 5—10 Minuten:

Eine aus 1-proz. Methylenblau und $^1/_2$-proz. Soda hergestellte Farblösung wird einige Tage bei 50—60° gehalten. Nach dem Erkalten tropfenweise Zusatz von einer Mischung von 2—3 Tropfen 1-proz. Eosinlösung + 1—2 ccm Wasser, bis der Eosinton verschwunden ist.

Methode von Zettnow[317].

1. Färbung der Präparate in folgender Mischung, 2—5 Minuten:

2 Teile einer Mischung von 50 ccm 1-proz. Methylenblaulösung (pur. med. Höchst), 3 ccm 5-proz. Sodalösung und 0,5 ccm 10-proz. alkohol. Thymollösung. 1 Teil 10-proz. Eosinlösung B Höchst.

2. Event. Differenzierung mit 0,5-proz. schwach essigsaurer Methylenblaulösung oder 0,2-proz. Eosinlösung.

3. Wasserspülung usw.

Methode von Michaelis[187].

Michaelis färbt ähnlich wie bei der älteren Nochtschen Methode die Präparate $^1/_4$ Stunde lang in folgender Mischung: Lösung von 2 g Methylenblau med. (Höchst) in 200 Wasser wird mit 10 ccm einer Normalnatronlauge versetzt. Zusatz von 5 Teile Eosinlösung 1:1000 zu einem Teil dieser Lösung.

Methode von Reuter[232 u. 233].

Färbung der in Alkohol oder Alkoholäther fixierten Präparate. 20—30 Minuten für frische Ausstriche, 3—4 Stunden für ältere in folgender Farbstofflösung:

Wäßrige Lösung von 1 Proz. Methylenblau pur. Höchst und 0,5 Proz. Natriumbikarbonat wird 2—3 Tage bei einer Temperatur 40—60° C gehalten, bis zum Auftreten der Nochtschen Rotreaktion. Nach dem Erkalten Filtration, Ausfällung mit gesättigter wäßriger Eosinlösung und Zusatz von etwas Eosin im Ueberschuß. Absaugen des Niederschlages mit Saugfilter; Auswaschen des Rückstandes mit destilliertem Wasser; Trocknen im Exsikkator oder Thermostaten. Von diesem Farbstoffe wird eine gesättigte alkoholische Stammlösung bereitet (etwa 0,2 Farbstoff auf 100 Alkohol) und mit 2 Proz. Anilinöl versetzt. Mit Hilfe der alkoholischen Stammlösung erfolgt die Bereitung der zur Färbung zu verwendenden, wäßrigen Lösung (1—2 Tropfen auf 1 ccm destillierten Wassers).

Methode von Assmann[7 u. 8].

A. Für Trockenpräparate:

1. Einlegen des mit dem zu färbenden unfixierten Objekte beschickten Objektträgers in eine saubere Petrischale und Uebergießen desselben mit 40 Tropfen der methylalkoholischen Jennerschen Farblösung derart, daß die letztere nicht über den Rand des Objektträgers überläuft: dieselbe verbleibt dann zum Zwecke der Fixation 3 Minuten auf dem Präparat.

2. Uebergießen mit 20 ccm destillierten Wassers, denen zuvor 5 Tropfen einer 1-prom. Kalium-carbonicum-Lösung unter kräftigem

Schütteln beigemischt wurden, und Umschütteln der Schale so lange, bis eine gleichmäßig klare, von Niederschlägen freie, hellviolette, überwiegend wäßrige Farblösung entstanden ist; 5 Minuten langes Färben in der letzteren.

3. Herausnehmen und unmittelbares Abtrocknen des Präparates ohne weitere Abspülung.

B. Für Gewebsschnitte:

1. Wie bei A, nur kann hier, da die Fixierung entbehrlich ist, Teil 2 ohne Verzug angeschlossen werden.

2. Ebenfalls wie bei A, nur füge man statt der alkalischen Kalium-carbonicum-Lösung 5 Tropfen einer 1-prom. Essigsäurelösung hinzu und färbe statt 5 Minuten 15 Minuten.

3. Herausnehmen, kurzes Abspülen in absolutem Alkohol, Abspülen in Xylol, Einbetten in neutralen Kanadabalsam. Der verwendete Alkohol muß durch einen ständigen Bodensatz von ausgeglühtem Kupfersulfat streng wasserfrei erhalten werden.

Methode nach Giemsa (1904)[87–93].

1. Härtung des lufttrockenen Ausstriches in Aethyl- oder schneller (2—3 Min.) in Methylalkohol.
2. Abtupfen mit Fließpapier.
3. Färben 10—15 Minuten mit der „Giemsalösung".
4. Waschen, Trocknen.

Färbung von Feuchtpräparaten nach Giemsa (1909).

1. Fixierung der feuchten, dünnen Deckglas-Ausstriche in Sublimatalkohol (konz. wäßrige Sublimatlösung zwei Teile, Alkohol abs. ein Teil) 12—24 St.
2. Waschen 5—10 Min. in folgender Lösung: Jodkali 2,5, Aqu. dest. 100,0, Lugolsche Lösung 3,0.
3. Abwaschen und 10 Minuten in eine 0,5-proz. Lösung von Natriumthiosulfat.
4. 4,5 Minuten Waschen in fließendem Wasser.
5. Färben in Giemsalösung 1—12 St.
6. Abspülen und durch folgende Reihe hindurch führen.
   A. Aceton 95 ccm, Xylol 5 ccm.
   B. Aceton 70 ccm, Xylol 30 ccm.
   C. Aceton 70 ccm, Xylol 30 ccm.
   D. Xylol pur. (eignet sich besonders zur Färbung von Trypanosomen und Spirochäten)

Für die Färbung von Schnittpräparaten dient folgende Modifikation:

1. Fixieren von nicht über 5 mm dicken Organstücken in Sublimatalkohol 2mal 24 Stunden (Lösung einmal erneuern, Hornpinzette!).
2. Einbetten in Paraffin.
3. Schneiden; Schnitte aufkleben.
4. Xylol, Alkohol von abnehmender Stärke, Wasser.
5. 10 Min. in Jodkali 2 g Aq. dest. 100 ccm, Lugolsche Jodjodkalilösung 3 ccm.
6. Wasserspülung. 10 Min. in 0,5-proz. wäßr. Natriumthiosulfatlösung, 5 Min. in Leitungs-, kurz in destill. Wasser.

7. Färben in Giemsalösung 2—12 St. (Farblösung nach $^1/_2$ St. erneuern).
8. Wasserspülung.
9. Siehe oben unter 6.
10. Cedernöl.

Schnellfärbung nach Giemsa (1910).

1. Verdünnung der Giemsalösung mit gleichen Teilen Methylalkohol.
2. Uebergießen des mit dünnem Ausstrich beschickten Objektträgers in einer Petrischale und $^1/_2$ Minute färben.
3. 10—15 ccm Aqua dest. Hinzufügen und 3—5 Minuten (Trypanosomen und Spirochäten) einwirken lassen.
4. Abspülen mit Wasser, Trocknen, Zedernöl.

Methode von Pick-Jacobson[133].

1. Färben mit folgender Lösung: Karbolfuchsin Ziehl 15 Tropfen, gesättigte alk. Methylenblaulösung 8 Tropfen, Aqua dest. 20,0.
2. Wasserspülung, Trocknen.

Methylenblau-Eosinfärbung.

Herstellung der Farblösung:
Für Ausstriche:
1. Färben $^1/_2$ Minute mit frischer Mischung von Löfflerscher Methylenblaulösung 30,0 mit gesättigter alk. Eosinlösung 10,0.
2. Wasserspülung.
Für Schnitte:
Siehe unten Färbemethode von Lentz für Hundswutkörperchen.

Ein von Schilling[258] angegebener Apparat gestattet das Aufbringen der Methylenblau-Eosin-Lösung im Momente der Mischung (Fig. 46).

Die Farblösungen haben die folgende Zusammensetzung:

1. Stammlösung. Mansonsches Borax-Methylenblau: Methylenblau med. Höchst 2 g, Borax 5 g, Wasser 93 g. Hiervon 2 Teile mit 98 Teilen Wasser verdünnt.
2. Eosin B, A extra Höchst 0,2 g auf 1000 Wasser.

Der Apparat besteht aus 2 kalibrierten Glasröhren mit 2 nahe beieinanderliegenden Ausflußöffnungen, die durch einen gemeinschaftlichen Hahn geöffnet werden und so ein gleichzeitiges Auftropfen der Lösungen auf den Objektträger gestatten. Die Färbung erfolgt in 8—10 Minuten.

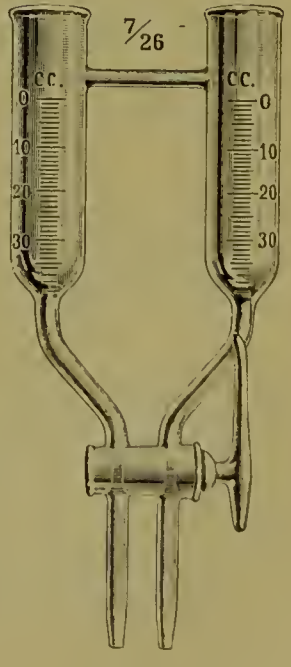


Fig. 46.

Methode von May-Grünwald[181].

1000 ccm einer 1-prom. wäßrigen Lösung von Eosin und Methylenblau med. Höchst werden gemischt und nach einigen Tagen filtriert. Der Rückstand wird mit Wasser gewaschen, bis dieses fast klar abläuft. Vom getrockneten Rückstand wird eine gesättigte Lösung in Methylalkohol hergestellt.

Färbung:

1. Färben ohne Fixierung der Deckglasausstriche (einige Minuten bis Stunden). Mit obiger Lösung.
2. Abspülen in Wasser, dem einige Tropfen der Farblösung zugesetzt sind.
3. Trocknen.
4. Kanadabalsam.

Methode der Chromatinfärbung von Mentz von Krogh[151] (für Schnitte).

1. Färben mit polychromem Methylenblau nach Unna (Grübler), 5 Minuten.
2. Wasserspülung.
3. Beizen, 1—15 Minuten in 2-proz. Chromsäure.
4. Wasserspülung.
5. Differenzieren in 5-proz. Gerbsäure bis die Schnitte hellblau erscheinen und einen rötlichvioletten Ton annehmen.
6. Wasserspülung.
7. Entwässern in absolutem Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

(Auch zur Färbung Negrischer Körperchen geeignet.)

Die Gramsche Methode.

Ueber die Prinzipien der Färbung nach Gram s. oben.

I. Für Ausstrichpräparate.

1. Färbung mit Anilinwassergentianaviolettlösung oder 2-proz. Karbolwassergentianaviolettlösung unter Erwärmen, 2 Minuten.
2. Behandeln mit folgender Lösung (Lugolsche Lösung), 1 bis 2 Minuten.

Jod	1,0,
Jodkalium	2,0,
Aq. dest.	300,0.

3. Entfärben in Alkohol, 10 Sekunden.
4. Nachfärben mit wäßriger Anilinfarbstofflösung.
5. Wasserspülung.

II. Für Schnitte.

1. Färbung in Anilinwassergentianaviolettlösung, 5—30 Minuten.
2. Behandeln mit Lugolscher Lösung, 1—2 Minuten.
3. Differenzierung in Alkohol, bis der Schnitt nahezu farblos erscheint.
4. Wasserspülung.
5. Nachfärbung mit Pikrokarmin- oder Vesuvinlösung.

Rezept der Pikrokarminlösung:

Karmin	1,0,
Aq. dest.	50,0,
Ammoniak	1,0.

Pikrinsäurezusatz, bis sich ein Niederschlag bildet; dieser wird in etwas Ammoniak gelöst. Zusatz einiger Tropfen Karbolsäure zur Lösung.

6. Abspülung in 60 Proz. Alkohol.
7. Entwässern, Aufhellen, Einschließen.

An Stelle der Nachfärbung (5) kann eine Vorfärbung mit den betreffenden Farbstoffen treten.

Modifikation von Kutscher[157].

Kutscher färbt, statt mit Anilinwassergentianaviolettlösung, allein mit Anilinwassergentianaviolettlösung, Alkohol und 5-proz. Karbolsäure zu gleichen Teilen 10—15 Minuten lang.

Modifikation von Günther[102].

Günther entfärbt 10 Sekunden mit salzsaurem Alkohol, dann mit Alkohol, bis das Präparat farblos erscheint.

Modifikation von Unna[293 u. 294].

Unna verwandte statt der Jodjodkalilösung, die häufig Niederschläge verursacht, Jod in statu nascendi, das er durch Mischung einer 5-proz. Jodkalilösung mit Wasserstoffsuperoxyd erzeugt.

Modifikation von Eisenberg[63—65].

1. Behandeln des fixierten Trockenpräparates mit 1-proz. wäßriger Lösung von Viktoriablau B (Günther), 3—5 Minuten lang.
2. Wasserspülung.
3. Beizen, 1—2 Minuten mit Lugolscher Lösung.
4. Differenzieren mit Nicolleschem Acetonalkohol, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird.
5. Wasserspülung.
6. Nachfärben mit 10-fach verdünntem Karbolfuchsin.

Modifikation von Dreyer[57].

1. Färben 3 Minuten in Karbolgentianaviolett.
2. Beizen 1 Minute in Jodjodkalium.
3. Entfärben in Alcohol absol.
4. Gegenfärbung mit verdünntem Karbolfuchsin (1:10), 20 Sekunden lang.

Modifikation von Nicolle[209].

I. Für Ausstrichpräparate.

1. Färben mit folgender Lösung unter Erwärmen, 1—5 Minuten.
   10,0 ccm gesättigte alkoholische Gentianaviolettlösung,
   100,0 ccm 1-proz. Karbolwasser.
2. Jodjodkalium, 4—6 Sekunden.
3. Entfärben in 3 Teilen Alc. abs. und 1 Teil Aceton.
4. Nachfärben usw.

II. Für Schnitte.

1. Vorfärbung mit alkoholischer Orthscher Karminlösung (5 Teile Orthsches Karmin, 1 Teil 95-proz. Alkohol).

2. Färbung mit der vorher unter 1 beschriebenen Lösung.
3. Jodjodkalium, 4—6 Sekunden.
4. Differenzierung mit absolutem Alkohol und $^1/_3$ Volumprozent Aceton.
5. Behandlung mit 95-proz. Alkohol und Pikrinsäurezusatz bis zur Gelbgrünfärbung, 1—5 Sekunden.
6. Entwässern mit absolutem Alkohol, Aufhellen, Einschließen.

Modifikation nach Weigert-Kühne[154–156].

1. Vorfärben mit Lithionkarminlösung — Karmin 2,5 bis 5 ad 100 gesättigt. wäßr. Lösung von Lithionkarbonat — $^1/_2$ Stunde.
2. Differenzierung in Alkohol oder salzsaurem Alkohol.
3. Wasserspülung.
4. Behandlung mit Kristallviolettlösung (konzentrierte Lösung verdünnt mit Wasser, dem einige Tropfen Salzsäure zugesetzt sind, im Verhältnis 1:10) 5—15 Minuten.
5. Abspülung mit Wasser oder 0,6-proz. Kochsalzlösung.
6. Trocknen des Schnittes auf Spatel oder Objektträger mit Fließpapier.
7. Behandlung mit Jodjodkaliumlösung 1—2 Minuten.
8. Abtrocknen mit Fließpapier.
9. Entfärbung mit Anilinöl, bis es keine Farbe mehr entzieht.
10. Xylol.
11. Einschließen.

Modifikation von F. Löffler[170–173].

1. Schnitte aus dem Alkohol direkt in folgende Farblösung: 10 ccm Karbolmethylviolett. 6 B-Lösung + 1 ccm alkohol. Methylenblaulösung.
2. Wasserspülung.
3. Jodjodkaliumlösung 2 Minuten.
4. 5-proz. wäßrige Salpetersäure 1 Minute oder in 3-proz. Salzsäurealkohol 10 Sekunden.
5. Absoluter Alkohol oder 30-proz. Acetonalkohol bis vollständige Entfärbung.
6. Verdünnte Fuchsinlösung zur Gegenfärbung.
7. Entwässern in Alkohol, Xylol, Balsam.

Modifikation von Stephan[276].

1. Färben der alkoholfixierten Schnitte in Methylviolett VI B-Karbolwasserlösung (10 ccm einer konz. alkohol. Methylviolett VI B-Lösung auf 40 ccm 2-proz. Karbolwasserlösung) 10 Minuten bis 1 Stunde.
2. Färben 10 Minuten in frisch bereitetem Gemisch von 10-proz. Ferricyankali- und 5-proz. Jodkalilösung im Verhältnis 1:2.
3. Wasserspülung.
4. Maximale Entfärbung in Alcohol absolut.
5. Xylol, Kanadabalsam (eventuell Gegenfärbung mit verd. Karbolfuchsin oder Eosin).

Von 3. ab Behandeln mit Glasnadeln.

Ersatz des Gramschen Verfahrens.

Methode von Claudius[51].

Sie entspricht der Methode von Gram. Der Pararosanalinfarbstoff bildet mit der Pikrinsäure einen Niederschlag, der von gewissen Bakterienarten sehr festgehalten wird.

a) Für Ausstriche.

1. Färbung in 1-proz. wäßriger Methylviolettlösung, 1 Minute.
2. Wasserspülung, Trocknung mit Fließpapier.
3. Spülung in halbgesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung, 1 Minute.
4. Wasserspülung, Trocknung mit Fließpapier.
5. Entfärbung in Chloroform oder Nelkenöl.
6. Trocknen mit Fließpapier, Einbetten.

Es färben sich alle nach Gram färbbaren Bakterien, ferner der Bacillus des malignen Oedems und des Rauschbrands.

b) Für Schnitte (auf dem Objektträger vorzunehmen).

1. Färben wie bei a) 2 Minuten und länger.
2. Wasserspülung, Trocknen mit Fließpapier.
3. Pikrinsäure wie bei a) 3.
4. Wasserspülung, sorgfältig trocknen mit Fließpapier.
5. Differenzieren mit Nelkenöl bis der Schnitt farblos erscheint, Xylol, Kanadabalsam.

Nach Eisenberg lassen gramnegative Bakterien mit der Tuschemethode (s. o.) eine dunklere Zentralpartie von einem hellen, scharf abgegrenzten Saum erkennen, gram-positive Bakterien nicht.

Pikrokarminlösung zur Kontrastfärbung der Gewebe (zitiert nach Abel).

Nach Friedländer bereitet: Karminlösung 1,0 in Aq. dest. 50,0 + Ammoniak 1,0. Zusatz gesättigter wäßriger Pikrinsäurelösung so lange, bis der sich bildende Niederschlag beim Umrühren nicht mehr gelöst wird. Etwas Ammoniakzusatz löst den Niederschlag wieder. Zur Verhinderung von Mikroorganismenwachstum in der Lösung setzt man einige Tropfen Karbolsäure zu. Vor dem Gebrauch zu filtrieren. Haltbare Lösung.

Nach Weigert hergestellt: Karmin 2 + Ammoniak 4 steht 24 Stunden. Dann 200 g konzentrierte wäßrige Pikrinsäurelösung hinzufügen, nach 24 Stunden Essigsäure tropfenweise, bis Niederschlag erfolgt, hinzu, dann Ammoniak tropfenweise, bis die Lösung klar ist.

Whitney[311] arbeitet mit folgender Lösung:

Von einer 1-proz. Pyronin- und einer 1-proz. Methylgrün-Lösung werden 4 Teile der ersteren mit einem Teil der letzteren gemischt; die Färbung geschieht unter kurzem Erwärmen über der Flamme. Die Zellkerne erscheinen blaugrün, die Bakterien lebhaft rot, rote Blutkörperchen sind gar nicht gefärbt.

Spezifische Färbungsmethoden.

Methoden zum Nachweis des Actinomyces und anderer Strahlenpilze in Schnitten.

Neben dem Gramschen Verfahren sind am gebräuchlichsten:

Methode von Boström[39 u. 40].

1. Färbung in Anilinwassergentianaviolettlösung.
2. Uebertragen direkt in Weigertsche Pikrokarminlösung.
3. Wasserspülung.
4. Alkoholbehandlung, bis die Schnitte rotgelb sind.
5. Aufhellen, Einschließen.

Methode von Israel[132].

1. Färbung in konzentrierter Lösung von Orcein in essigsaurem Wasser, mehrere Stunden.
2. Wasserspülung.
3. Behandlung mit absolutem Alkohol, einige Sekunden.
4. Trocknen, Einschließen.

Methode von Weigert[303–305]

1. Färbung 1 Stunde in dunkelroter Lösung von Orseille in:

Alcohol absol.	20,0
Acid. acetic.	5,0
Aq. dest.	40,0.

2. Waschung in Alkohol.
3. Färbung in 1-proz. wäßriger Gentianaviolettlösung.
4. Entwässern in 60-proz. Alkohol, Aufhellen, Einschließen.

Methode von Ciechanowski[50].

1. Formalinhärtung, Celloidineinbettung.
2. Färben in 3—4mal verdünntem Anilinwassergentianaviolett unter Erwärmen bis Dampfbildung.
3. Abspülen in 0,6-proz. NaCl.
4. Uebertragen der Schnitte bis 1 Minute in eine wäßrige Jodjodkaliumlösung 1:2:300.
5. Abtrocknen in Fließpapier.
6. Abspülen in 70-proz. Alkohol.
7. Erwärmen bis Dampfbildung in:

Orcein	1,0
Salzsäure	1,0
Aqua dest.	100,0.

8. Differenzieren in:

Salzsäure	1,0
96-proz. Alk.	200,0
Aqua dest.	50,0.

9. Einlegen in absoluten Alkohol bis die Drusen als dunkelblau gefärbte Punkte auf rotem Hintergrund scharf hervortreten.
10. Aufhellen in Xylol, Kanadabalsam.

Methode von A. Kraus zur Färbung der Hyphomyceten im Horngewebe.

1. Bei Haaren vor der Färbung Entfetten in Aether-Alkohol.
2. Methylenazur 5—10 Minuten.
3. Wasserspülung.
4. Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

(Pilze hellblau, Grundgewebe mehr oder weniger entfärbt.)

Färbung von Gonokokken.

Von allgemeinen Methoden sind speziell für Gonokokken geeignet:

Methode nach Pappenheim-Saathoff[217, 246].

Farblösung:

Methylgrün	0,15,
Pyronin	0,5,
96-proz. Alkohol	5,0,
Glyzerin	20,0,
2-proz. Karbolwasser ad	100,0 filtra.

Ausstriche: 1—2 Minuten färben, Wasserspülung.

Schnitte:

1. 2—4 Minuten färben, Wasserspülung bis grünliche Färbung des Spülwassers in blaurötliche übergeht, leicht abtrocknen.
2. Abspülen wenige Sekunden in abs. Alkohol.
3. Gehen keine rötlichen Farbwolken mehr ab, Aufhellen in Xylol, Balsam.

In Celloidinschnitten das Celloidin nicht entfernen.

Methylenblau-Eosinfärbung (siehe oben).

May-Grünwaldsche Methode (siehe oben).

Giemsasche Methode (siehe oben).

Pick-Jakobsohnsche Methode (siehe oben).

Methode von Löffler:

1. Fixieren der Ausstriche in Alcohol absol. + Aether āā.
2. Färben unter Erwärmen in folgender Lösung:

Wäßrige Borax- (2,5-proz.), Methylenblau- (1-proz.) Lösung	20,0
polychrom. Methylenblau Unna (Dr. Grübler)	10,0
0,05-proz. wäßrige Bromeosin extra A. G.-(Höchst) Lösung	50,0.

3. Wasserspülung.
4. Entfärben mit Alcohol absol. 177 + 10-proz. wäßriger Bromeosin B extra Höchst-Lösung 20 + Acid. acet. 3.
5. Wasserspülung (Bakterien dunkelblau, Kerne blaßblau, Zellen blaßrosa).

Methode von A. Neisser[212]:

1. Färbung in gesätt. alkohol. Eosinlösung unter Erwärmen einige Minuten.
2. Absaugen des Eosins mit Fließpapier.
3. Aufbringen von gesätt. alkohol. Methylenblaulösung ($^1/_4$ Minute!).
4. Wasserspülung.

(Gonokokken und Zellkerne blau, Zellleiber rot.)

Methode von Pappenheim[217, 217a u. b]:

1. Färben, 1 Minute mit folgender Lösung: 1 Messerspitze Methylengrün + den 4. Teil Pyronin (Grübler) werden in 5 ccm Aqua dest. gelöst (soll blauviolette Färbung haben).
2. Wasserspülung.

(Gonokokken rot, Kerne blau.)

Methode von Brönnum[42] 10 Sekunden mit einer 1:10000 Methylenblaulösung.

Methode von v. Wahl[300] 5—15 Sekunden mit folgender Lösung:

Konz. alkoh. Auraminlösung	2,0 ccm,
konz. alkoh. Thioninlösung	2,0 „
konz. wäßr. Methylengrünlösung	3,0 „
Spiritus (95-grädig)	1,5 „
Aqua dest.	6,0 „

Methode von Gethe[86] 5—8 Minuten mit Karbol-Methylgrün-Pyronin, darauf Wasserspülung.

Methode von Leszcynski[166]:

1. Trocknen der dünnen Ausstriche.
2. Fixieren über der Flamme.
3. Einlegen 60 Sekunden in eine Thioninlösung (Sol. saturat. aquos. Thionin 10,0, Aq. dest. 88,0, Acid. carbol. liquef. 2,0).
4. Wasserspülung.
5. Einlegen 60 Sekunden in eine Pikrinsäurelösung (Sol. saturat. aquos. acid. picrin., Sol. aquos. kalii caustic. $^1/_{1000}$ āā 50 ccm).
6. Direkt 5 Sekunden in Alcohol absolutus.
7. Wasserspülung, Trocknen; Einlegen in Kanadabalsam.

(Der Leib der Eiterkörperchen ist strohgelb, die Kerne sind rotviolett, die Epithelien etwas heller. Die Gonokokken treten als schwarze, scharf konturierte Diplokokken plastisch hervor.)

Färbung der säurefesten Bakterien.

I. In Ausstrichpräparaten.

Methode von Ehrlich[59—61].

1. Färbung in Anilinwasserfuchsinlösung (oder Anilinwassergentianaviolettlösung) unter Erwärmen, 3—5 Minuten.
2. Entfärbung in 35-proz. Salpetersäure, $^1/_4$—1 Minute.
3. Behandlung mit 60-proz. Alkohol, bis keine Farbwolken mehr aufsteigen.
4. Nachfärbung mit wäßriger Methylenblau- resp. Bismarckbraunlösung.

Methode von Ziehl-Neelsen[318].

1. Färbung mit Karbolfuchsin unter Erwärmen bis zur Dampfbildung 2 Minuten. Rezept der Karbolfuchsinlösung:

Acid. carbol. cyst.	5,0
Alkohol	10,0
Fuchsin	1,0
Aq. dest.	100,0.

2. Entfärbung in 20-proz. Salpetersäure 5 Sekunden.
3. Entfärbung in 60-proz. Alkohol, bis das Präparat farblos erscheint.
4. Nachfärbung mit wäßriger Methylenblaulösung.
5. Wasserspülung usw.

Methode von Fränkel-Gabbet[75].

1. Wie bei der vorigen Methode.
2. Entfärbung und Gegenfärbung gleichzeitig mit einer gesättigten Lösung von Methylenblau in:

Alkohol	50,
Schwefelsäure	25,
Aqua dest.	100.

Methode von Czaplewsky[52 u. 53].

Czaplewsky verwandte statt der Mineralsäure einen sauren Farbstoff, Fluorescin, um eine Entfärbung einzelner Tuberkelbacillen durch die stärker wirkende Mineralsäure zu vermeiden.

1. Färbung mit erwärmtem Karbolfuchsin.
2. Ohne Wasserspülung einige Sekunden eintauchen in eine Lösung von

Fluorescin (Grübler)	1,0	2 Tage lang stehen lassen,
Alkohol	100	vom Bodensatz abgießen,

mit Methylenblau 5,0, einen Tag stehen lassen, vom Bodensatz abgießen.
3. Eintauchen 10 bis 12mal in eine Lösung von Methylenblau 5,0, Alkohol 100, Wasserspülung.

Methode von Weichselbaum[301].

1. Färbung in Karbolfuchsin unter Erwärmen (2—3 Minuten).
2. Wasserspülung.
3. Nachfärbung mit alkoholischer Methylenblaulösung.
4. Wasserspülung usw.

Weitere Modifikationen bei der Färbung der säurefesten Bakterien.

Müller[190] ersetzte, da bei der Säurebehandlung der Tuberkelbacillen ein Entfärbungsverlust eintritt, die Säure durch Kaliumperkarbonat. Viertelstündige Einwirkung. Statt der Kaliumperkarbonatlösung verwandte er auch alkalische Wasserstoffsuperoxydlösung. Einwirkung einige Minuten.

Rondelli und Buskalioni empfehlen zur Entfärbung der Tuberkelbacillen Eau de Javelle. Dauer der Entfärbung 2—3 Minuten.

Dorset[56] gelang eine spezifische Färbung des Tuberkelbacillus mit Sudan 3, einem Fettfarbstoff.

Eisenberg[63—65] verstärkt die Gram- bzw. Fuchsinfärbung durch Behandeln mit erwärmter Farblösung und Nachbehandeln mit erwärmter Beize. (S. hier weitere Methoden der T.B.-Färbung.)

C. Spengler und v. Betegh[28—30] geben verschiedene Methoden zur T.B.-Färbung an, mit deren Hilfe die Sporennatur der in den Tuberkelbacillen vorhandenen Körnchen bewiesen und eine Differen-

tialdiagnose zwischen Perlsuchtbacillen und Tuberkelbacillen ermöglicht werden sollte.

Kronberger[152] will durch Behandeln mit verdünnter Jodtinktur Hüllen und Sporen der Tuberkelbacillen gleichzeitig darstellen. Durch die Methode sollen Smegmabacillen sich nicht färben lassen.

Assmann[7u.8] glaubt durch eine Kombination der Ziehlschen Färbung mit der Jennerschen intra- und extracellulär gelegene Tuberkelbacillen erkennen zu können.

Ocawa[213] färbt anstatt mit Karbolfuchsin Tuberkel- und Leprabacillen mit Mischungen von Fuchsin und Kreosot-, Kampfer-, Menthol- und Terpentinwasser. Besonders gut färbt Kreosotfuchsin.

II. In Schnitten.

Die Methode zum Nachweis von Tuberkelbacillen in Schnitten entspricht im allgemeinen ganz der für Deckgläschen gebräuchlichen, natürlich unter Berücksichtigung der für Schnittpräparate im allgemeinen gültigen Prinzipien. Dauer der Fuchsinfärbung mindestens $^1/_2$ Stunde.

Methode der Tuberkelbacillenfärbung im Schnitt von Herman-Caan[115–117].

1. Den in 10-proz. Formalinlösung mindestens 3—4 Stunden gehärteten Gefrierschnitt auf einen mit koagulierter Eiweißglyzerinlösung versehenem Objektträger bringen.
2. Ueber der Flamme vorsichtig trocknen.
3. Mit sorgfältig filtriertem salzsauren Karmin (Mayers Karminlösung) 10 Minuten verfärben.
4. Differenzieren mit 1-proz. Salzsäurealkohol (1 ccm reiner Salzsäure auf 100 ccm 70-proz. Alk.) bis die Kerne deutlich sichtbar werden.
5. Wasserspülung.
6. Färbung mit gründlich gemischter und filtrierter Ammoniumkarbonat-Kristallviolettlösung (3 Teile einer 1-proz. Ammoniumkarbonatlösung in dest. Wasser + 1 Teil einer 3-proz. Kristallviolettlösung in 96-proz. Alkohol).
7. Entfärben mit 10-proz. Salpetersäure einige Sekunden, dann mittels 96-proz. Alkohol, bis der ursprüngliche Karminton wiederkehrt.
8. Trocknen. Kanadabalsam.

(Die Methode eignet sich auch für Paraffinschnitte — das Paraffin muß natürlich entfernt werden — und für Ausstrichpräparate.)

Färbung der Tuberkelbacillen von Gasis[80–82].

1. 4—5 ccm folgender frisch bereiteter Eosinlösung:

Eosin 1 g
Alkohol 5 ccm
Wasser 5 „

werden mit einem linsengroßen Stück kristallisierten Quecksilberchlorids gekocht, bis die Farblösung in Schwebefällung versetzt ist.

2. Uebergießen des Präparates, erwärmen bis Dämpfe aufsteigen, 1 Minute stehen lassen, ev. die verdunstete Farblösung erneuern.

3. Beträufeln mit folgender Lösung, bis die rote Farbe durch eine tiefgrüne ersetzt ist:

1 g Natriumhydroxyd,
0,5 Jodkali in 100 ccm 50-proz. Alkohol.

4. Spülen mit 90-proz. Alkohol.
5. Wasserspülung (Aqua dest.).
6. Nachfärben mit einer Lösung von 0,1 g Methylenblau in 80,0 Aqua dest., dazu 20,0 Alkohol und 1,0 Salzsäure.
7. Wasserspülung. Trocknen.

Färbung des nicht nach Ziehl färbbaren Tuberkulosevirus.

Methode von Much (Gram II)[191–193].

1. Konzentrierte alkohl. Lösung von Methylviolett BN 10 ccm in 100 ccm 2-proz. Karbolsäurelösung: Färben 24—48 Stunden.
2. Jodjodkalilösung 12 Min.
3. 5-proz. Salpetersäure 1 Min.
4. 3-proz. Salzsäure 10 Sek.
5. Aceton-Alkohol āā bis kein Farbstoff mehr abfließt.
6. Gegenfärbung mit stark verdünntem Fuchsin oder 1-proz. Safraninlösung 5—10 Sekunden oder Bismarckbraun 1 Minute.
7. Wasserspülung. Trocknen (eignet sich auch zur Darstellung von Leprabacillen).

Methode nach Hatano[109].

1. Erwärmung bis zur Dampfbildung mit Karbolfuchsin, 5 Minuten.
2. Wasserspülung.
3. 10—30 Sekunden in 25-proz. Schwefelsäure.
4. Einlegen in 75-proz. Alkohol bis zum Verschwinden der Farbe.
5. Nachfärbung mit Methylenblaulösung (2 Minuten).
6. Abspülen in Wasser.
7. Auftropfen von filtriertem Anilinwassergentianaviolett.
8. Erwärmung bis zur Dampfbildung.
9. 3—5 Minuten stehen lassen, Flüssigkeit abschütteln.
10. Jodjodkaliumlösung (3—10 Min. lang).
11. Entfärbung mit abs. Alkohol.
12. Toluol, Kanadbalsam.

Eine gleichzeitige Färbung von Ziehl-negativen und Ziehl-positiven Formen wurde auch durch die folgenden Modifikationen erreicht:

Färbung mit einer Mischung von 1 Teil der von Much angegebenen Methylenviolettlösung mit 3 Teilen Karbolfuchsin (Weiss[306–308]) oder mit 4 Teilen Karbolfuchsin (Aronson[6]).

Differential-diagnostische Färbung der Leprabacillen.

Methode von Baumgarten[13].

1. Färbung in sehr verdünnter alkoholischer Fuchsinlösung 5 Minuten.
2. Entfärbung 20 Sekunden in einer Mischung von Alkohol 10 Teile, Salpetersäure 1 Teil.
3. Wasserspülung.

4. Nachfärbung mit Methylenblau. Der Tuberkelbacillus ist schwerer färbbar als der Lepraerreger und bleibt bei dieser Methode noch ungefärbt.

Methode nach Yamamoto[315].

1. Das lufttrockene Präparat (Sputum muß mit Hühnereiweiß auf den Objektträger gebracht werden) in der Flamme fixieren.
2. 10 Minuten in 5-proz. Silbernitratlösung bei 55—60 Grad erwärmen.
3. 5 Minuten in folgender Lösung reduzieren:

Acid. pyrogallic. 2,0,
Acid. tannic. 1,0,
Aqua dest. ad. 100,0.

4. Entfernung des Niederschlages durch mit Wasser erweichtes Fließpapier.
5. Trocknen, Kanadabalsam.

(Leprabacillen farblos, Tuberkelbacillen schwarz.)

Eine Doppelfärbung von lebenden und abgestorbenen Bacillen im Lepragewebe erreicht Unna[293–294] auf folgende Weise:

1. Vorbehandeln des frischen Gewebes mit einer 1-promill. Salpeter- oder Schwefelsäure.
2. Färbung der lebenden Bacillen mit Viktoriablau, der abgestorbenen Bacillen mit Safranin.

Fontes empfiehlt zur Unterscheidung der echten von anderen säurefesten Bacillen folgendes Verfahren:

1. Färben der Präparate mit Ziehls Karbolfuchsin.
2. Wasserspülung.
3. Färben mit Karbolkristallviolett, 2 Minuten.
4. Behandlung mit Lugol, bis sich kein Metallspiegel mehr bildet: Behandeln mit Acetonalkohol (Aceton und Alkohol in gleichen Teilen).
5. Waschen in Leitungswasser.
6. Färben mit Methylenblaulösung.

(Die Tuberkelbacillen erscheinen rot gefärbt und enthalten im Innern stark violett gefärbte, durch Zwischenräume getrennte Granulationen. Die Pseudotuberkelbacillen erscheinen angeblich violett gefärbt und ohne roten Saum mit dichteren Granulationen.)

Färbung von Spirochäten, im besonderen der Spirochaeta pallida.

Methode von Schaudinn und Hofmann[251].

1. Fixieren in Alcohol abs. 15—20 Minuten oder in der Flamme.
2. Färben nach Giemsa 1904 (siehe oben) 15—60 Minuten ohne Erwärmen.
3. Wasserspülen.

Schnellfärbung.

Mit „Giemsas verdünnter (siehe oben) neuer Farblösung“ übergießen, $^1/_4$ Minute erhitzen bis zu leichter Dampfbildung, abgießen, dies 4-mal wiederholen.

Wasserspülung.

(Spirochäten intensiv dunkelrot, Zellen blau, Kerne rot, Erythrocyten rosa.)

Methode nach Löffler[170—175].

1. Fixieren mit Alcohol absol. + Aether āā.
2. Färben mit 3 Tropfen 0,5-proz. Natr. arsenicosum-Lösung in Aq. dest. + 1 Tr. 0,5-proz. wäßr. Lösung von „Malachitgrün krist. chem. rein“ (Höchst), erwärmen bis zur Dampfbildung 1 Minute.
3. Wasserspülung.
4. Färbung mit auf Siedehitze gebrachter Lösung von 5 ccm einer Mischung von Glycerin puriss. 0,5 mit Aqua dest. 100,0 + 5—10 Tropfen Giemsa-Romanowsky-Lösung, 1—5 Minuten.
5. Wasserspülung.

Methode nach Reitmann[231].

1. Das dünn ausgestrichene, lufttrockene Präparat 10 Minuten in reichlicher Menge absoluten Alkohols fixieren.
2. Durch Aq. dest. auf 5 Minuten in 2-proz. Phosphorwolframsäurelösung überführen.
3. Diese Beize mit Aq. dest. und 70-proz. Alkohol gründlich abspülen.
4. Das Präparat wieder in destilliertes Wasser bringen und nach Abtrocknen der nichtbeschickten Fläche mit unverdünnter Karbolfuchsinlösung unter Erwärmen über der Flamme bis zur intensiven Dampfbildung färben.
5. Wasserspülung.
6. Kurzes Eintauchen in 70-proz. Alkohol und nochmals Wasserspülung, bis keine deutlichen Farbwolken mehr abgehen.
7. Trocknen.

(Zellkerne dunkel, Protoplasma licht, Kerne ganz hell, Spirochäten rot.)

Methode von Oppenheim und Sachs[215].

1. Färben der lufttrockenen unfixierten Präparate mit folgender Farblösung unter leichtem Erwärmen:

5-proz. wäßrige Karbolsäurelösung 100,0 ccm
konz. alkohl. Gentianaviolettlösung 10,0 ccm

2. Wasserspülung.
3. Trocknen, Kanadabalsam.

Methode nach Simonelli & Bandi[266].

Herstellung der Farblösung: In je 1 l Aq. dest. wird gesondert 1,0 g Eosin (nach Grübler) und in 1 g Methylenblau gelöst, die Lösungen werden gemischt, 2—7 Tage in Ruhe belassen, filtriert; der auf dem Filter zurückgebliebene Niederschlag wird mit destilliertem Wasser so lange ausgespült, daß die filtrierende Flüssigkeit klar wird; dann Rückstand trocknen lassen, hiervon eine gesättigte Lösung in reinem Methylalkohol herstellen.

Färbung:

1. Das lufttrockene Präparat mit der Lösung 4—10 Sekunden übergießen.
2. Waschen mit destilliertem Wasser.
3. Balsam.

Die Autoren benützen auch die Ziehlsche Lösung und die sonst in der bakteriologischen Technik gebräuchlichen Antilinfarben, erhitzt.

Methode nach Schereschewsky[253–255].

a) 1. Fixieren der feuchten Präparate in 1-proz. Osmiumsäuredämpfen.

2. Lufttrocken werden lassen.

3. Färben wie folgt: 10 ccm einer 0,5-proz. Glyzerinlösung + 10 Tropfen Giemsalösung werden bis zum Sieden erhitzt und das Präparat mit der Lösung übergossen, 2 Minuten einwirken lassen, darauf abgießen.

4. Die Färbung 2—3mal wiederholen.

b) 1. Fixieren.

2. In eine Petrischale mit Giemsalösung (1 Teil Giemsalösung aut 8—10 Teile Aq. dest) legen, die Schale auf ein dampfendes Wasserbad, zugedeckt 10—15 Minuten stehen lassen.

3. Gegen Ende der Färbung neue Giemsalösung zugeben.

Schnellfärbemethode von Proca & Vasilescu[230].

1. Färben 10 Minuten in folgender Lösung:

Reine Karbolsäure	50,0
Tannin	40,0
Aqua dest.	100,0
basisches Fuchsin	2,5
Alcoh. abs.	100,0

2. Wasserspülung, Trocknen.

3. Färben 1—5 Minuten in folgender Lösung:

Konz. alkoh. Gentianaviolettlösung	10,0 ccm
Karbolsäure	5,0 „
Aqua dest.	100,0 „

4. Wasserspülung, Trocknen, Einbetten.

Methode von Davidsohn[54].

1. Färben des fixierten Ausstrichpräparates, $^1/_2$—40 Stunden mit folgender Lösung: 1 Messerspitze Kresylviolett (R extra der Mühlheimer Farbenfabrik) wird in 100,0 Aqua dest. gelöst. (Es soll ein Teil des Farbstoffes ungelöst bleiben), filtrieren.

2. Wasserspülung.

Methode von Goldhorn[98].

1. Färben der nicht filtrierten Ausstrichpräparate einige Sekunden mit nachstehender Lösung:

Methylenblaulösung	2,0
Lithiumkarbonat	2,0
Aqua dest.	200,0

Erhitzen der Mischung; nach dem Erkalten Filtrieren und die Hälfte der Lösung mit 5-proz. Essigsäure bis deutlich saure Reaktion eingetreten, versetzen. Mischen beider Hälften und Zusetzen von $^1/_2$-proz. Eosinlösung bis die filtrierte Farblösung blaßblau und leicht fluoreszierend erscheint, Abfiltrieren des Niederschlages, Trocknen und zu ca. 1 Proz. in Methylalkohol lösen.

2. Wasserspülung.

Methode von Marino.

1. Färben mit folgender Lösung, 10 Minuten:
   Azurblau 0,04
   Methylalkohol 20,0
2. Ohne Wasserspülung nachfärben in wäßriger Eosinlösung (1:20000), 1—2 Minuten.

Methode von Nicolas, Favre & André[208].

1. Färben mit folgender Farblösung, 18—24 Stunden:
   Azur-II-Lösung (1:1000) 5,0
   Eosinlösung (1:1000) 10,0
   Aqua dest. 40,0
2. Wasserspülung.
3. Einlegen 1—2 Minuten in 5-proz. Tanninlösung.
4. Wasserspülung, Trocknen.

Methode von Herxheimer[118].

1. Fixieren in Alkohol.
2. Färben 15 Minuten lang in Lösung von:
   Gentianaviolett 10,0
   100° Aqua dest. 100,0

(Nach Erkalten filtrieren.)

4. Wasserspülung.
5. Trocknen, Kanadabalsam.

Methode von Dudgeon[58].

1. Färben mit 1-proz. Lösung von Leishmanpulver in Alkohol, 30 Minuten (Fixieren überflüssig).
2. Verdünnen der aufgetropften Farbstofflösung mit Aqua dest., Weiterfärben.
3. Wasserspülung.
4. Trocknen, Kanadabalsam.

Methode von M. Stern[278].

1. Stehenlassen des lufttrockenen Ausstriches in einer 10-proz. Argent.-nitric.-Lösung bei diffusem Tageslicht — das Gefäß muß farblos sein — einige Stunden.
2. Nachdem das Präparat einen bräunlichen Ton und metallischen Glanz angenommen, Wasserspülung. (Spirochäten schwarz auf braunem bez. farblosem Grunde.)

Methode von Berger[16–18].

1. Einlegen 5—10 Minuten in Alc. absol.
2. Trocknen.
3. Auftropfen von 5 Tropfen Löfflermethylenblau.
4. Nach $^1/_2$ Minute Hinzufügen von 3 Tropfen Azur-II-Lösung.
5. Nach $^1/_2$ Minute Zusetzen von 6 Tropfen Giemsalösung.
6. Nach 2 Minuten Wasserspülung.
7. Trocknen mit Fließpapier, Kanadabalsam.

oder nach dem Fixieren und Trocknen:

3. Vorbehandeln mit einigen Tropfen Azur-II-Lösung (nach Giemsa) 1 Minute.
4. Wasserspülung.
5. Trocknen.
6. Kurzes Durchziehen durch die Flamme.
7. 3—5 Minuten einige Tropfen folgender Dahlialösung einwirken lassen:

4 ccm konz. alkoh. Dahlialösung,
20 ccm Aqua dest.

8. Wasserspülung.
9. Trocknen.

Methode von Kalb[137].

1. Färben mit folgender Lösung unter 1—2maligem Erhitzen bis zum Aufdampfen.

Eosin B A	0,5
Alkohol (70-proz.)	50,0
Triacid	30,0.

(Die Lösung ist vor Gebrauch zu schütteln.)

2. Uebergießen mit Wasser.
3. Uebergießen mit Essigsäure (1 :10) 2—3mal.
4. Eventuelle Nachbehandlung mit 20-proz. wäßriger Tanninlösung. (Bakt. und Spirochäten erscheinen ungefärbt.)

Methode von E. Hoffmann & Halle[125].

1. Gut gereinigte Objektträger werden 2 Minuten Osmiumdämpfen ausgesetzt (5 ccm einer 1-proz. Osmiumsäurelösung + 10 Tropfen Eisessig).
2. Ausstreichen auf der so behandelten Seite des Objektträgers und in noch feuchtem Zustand 1—2 Minuten in Osmiumdämpfen weiter fixieren.
3. Nach völligem Lufttrockenwerden 1 Minute färben in dünner, schwach hellroter Lösung von Kaliumpermanganat.
4. Wasserspülung, Trocknen mit Fließpapier.
5. Färbung mit Eosin-Azur nach Giemsa.

Kraus behandelt die fertigen Präparate zur Beseitigung der Niederschläge noch mit einer 30-proz. wäßrigen Tanninlösung.

Methode von Forest[74].

1. Fixieren der feuchten Ausstriche in Osmium- oder Formalindämpfen nach Weidenreich.
2. Färben mit Giemsalösung (10—15 Tropfen auf 10 ccm dest. Wassers), 12—16 Stunden lang.
3. Während der letzten halben Stunde die Farbflüssigkeit bis zum Dampfen erwärmen, Abspülung in fließendem Wasser, 2 Minuten lang.

Methode von Lenartowicz und Potrzobowski[161].

1. Die gereinigten Objektträger werden 5 Sekunden über eine $^1/_2$—2-proz. Osmiumsäurelösung gehalten.
2. Ausstreichen auf der so vorbehandelten Fläche.

3. Wieder fixieren, 10—20 Sekunden über Osmiumsäure.
4. Färben mit Ziehlscher Lösung, $^1/_4$—1 Minute.
5. Wasserspülung.
(Serum rosa, Pallida als Negativ.)
6. Ev. Kontrastfärbung mit konz. alkohol. Methylenblau oder 10-proz. Karbolmethylenblau (es färben sich nur andere Spirochäten).

Plöger[226] taucht die bestrichenen und trockenen Objektträger für eine Minute in eine Gentianaviolettlösung (10-proz. konzentrierte alkoholische Gentianaviolettlösung in $2^1/_4$-proz. Karbollösung). Dann spült er gut mit Wasser ab.

Zabolotny[247] beizt nach Fixierung des Präparates mit 5-proz. Karbolsäurelösung und färbt sodann $^1/_4$ Stunde lang mit einem Gemisch von 0,1 Proz. Azur und 0,2 Proz. Eosin unter Erwärmen.

Borrel & Burnet[38] behandeln die Präparate mit Löfflerscher Beize und färben mit Ziehlscher Lösung nach.

Weitlaner[62] färbte mit gewöhnlichem Löfflerschen Methylenblau.

H. Ehrlich & Lenartowicz empfehlen 1—5 Proz. Karbolwasserzusatz zu den Farblösungen.

Färben von Feucht- und Schnittpräparaten.

Methode der Silberimprägnierung in Schnitten nach Levaditi und Hoffmann.

1. Höchstens 2 mm dicke Organscheiben 24 Std. in Formalin 1 + Aq. 9 fixieren.
2. 96-proz. Alkohol ca. 15 Std.
3. Einlegen in Wasser bis Scheiben sinken. Wasser mehrmals wechseln.
4. Einhängen der Scheiben an Zwirnsfäden in folgende frische Mischung:

1,5-proz. $AgNO_3$-Lösung	90,0
reinstes Pyridin	10,0

in dunkler Flasche mit Glasstopfen (auch bis zu 6 Tagen in dieser Lösung lassen!).

5. Uebertragen (nach Abspülen in 10-proz. Pyridinlösung) in frische Mischung: 90 ccm frisch hergestellter 4-proz. wäßr. Pyrogallollösung, 10 ccm Aceton; davon 85 ccm + 15 ccm Pyridin puriss. In dunkler Flasche mit Glasstopfen. 15 Stunden (auch bis zu zwei Tagen). Am besten vor Einlegen in Flasche Scheibe in Schälchen mit Lösung im Dunkeln abspülen.
6. Wasserspülung, Einlegen in verdünntem, dann absol. Alkohol, Xylol, Einbetten. (Spirochäten schwarz infolge Versilberung.)

Weitere Silberimprägnierungsmethoden.

Versé zog das Silber aus den nach Levaditi gefärbten Präparaten wieder heraus, um sich an derselben Stelle im Schnitt durch andere Farbreaktionen über die Gewebsveränderungen genauer orientieren zu können:

1. Einlegen der Schnitte in Jodjodkaliumlösung.
(An Stelle der Jodjodkaliumlösung kann auch eine 10-proz. Ferrocyankaliumlösung verwendet werden.)

2. Differenzieren in einer 20—25-proz. Natriumthiosulfatlösung.

Knochen müssen vor der Silberimprägnation mit salpetersaurem Alkohol entkalkt werden.

Dohi bediente sich zum Entsilbern folgender Methoden:

I. 1. Paraffinschnitte der Silberpräparate in Xylol, 10—20 Minuten.

2. Einige Minuten in absoluten Alkohol.

3. Einige Minuten in Wasser.

4. 30 Sekunden bis 1 Minute in Lugolsche Lösung (1 g Jod, 2 g Jodkali in 300 Aqua dest.).

5. 1—3 Minuten in Aetzammonlösung (1—5-proz.).

6. Auswaschen in Wasser.

7. Eventuell Kernfärbung anschließen.

Ferner:

II. 1.—3. wie oben.

4. 30 Sekunden bis 1 Minute in Jodtinktur oder 2—10-fach mit Wasser verdünnte Jodtinktur.

5. 1—3 Minuten in 5—20-proz. Natriumsulfitlösung.

6. Auswaschen in Alkohol, dann in Wasser.

III. 1.—3. wie oben.

4. Uebertragen auf $^1/_2$—1 Minute in 1—5-proz. Kaliumcyanidlösung.

5. Auswaschen in Wasser.

Methode von Barannikoff[12].

1. Fixieren in 5—10-proz. Formalin, oder Zenkersche Flüssigkeit oder Kultschitzkysche Flüssigkeit oder Schaudinns Lösung u. a.

2. Auswaschen (eventuell mit Jodkali und Wasserstoffsuperoxyd).

3. Einlegen in Alkohol steigender Konzentration.

4. Aufbewahrung in 80-proz. Alkohol.

5. Einlegen von 2—5 mm dicken Stückchen in Alkoholäther, weiter in 80—50—30-proz. Alkohol, dann in 1—1,25-proz. Lösung von Argentum nitricum (etwa das 12—15-fache Volumen des Materials). Bei 42° C bleiben die Stücke 48—120 Stunden in der Lösung.

6. Abkühlen lassen.

7. 1 Stunde in zehnmal gewechseltem Wasser spülen, dann bei Zimmertemperatur 15—24 Stunden, je nach Konsistenz des Materials in 3—4-proz. Pyrogallussäure oder 10—75-proz. Agfa-Rodinal einlegen.

8. 1 Stunde in strömendes Wasser, in Alkohol steigender Konzentration, Alkoholäther, Aether, Celloidin. Mikrotomschnitte (15—30 μ) gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin, Methylenblau-Eosin.

Färbung der Spirochaete pallida im Schnittpräparat nach Giemsa-Schmorl.

1. Fixieren in 4-proz. Formalin.

2. Anfertigen dünner Gefrierschnitte.

3. Auffangen in Aq. dest.

4. Färben in Giemsalösung 1 Stunde.

5. Uebertragen in frische Giemsalösung, 12—24 Stunden.
6. Kurz abspülen in dest. Wasser. (Einbringen kurze Zeit in konzentrierte Kalialaunlösung, wenn in Glyzeringelatine konserviert werden soll.)
7. Abspülen in Aq. dest.
8. Kanadabalsam oder Glyzeringelatine.

Herxheimer und Hübner[119] färben mit Nielblau, Gottberg[100] verwendet die Heidenhainsche Eisenhämatoxylinfärbung und das Hansenschen Eisenhämatoxylingemisch.

Simmonds[267] bedient sich als Unterfärbung in Gewebsschnitten einer wäßrigen Safraninlösung mit kurzer Pikrineinwirkung:

1. 5 Minuten Safranin.
2. 1 Minute Alkohol.
3. 2 Sekunden wäßriges Pikrin.
4. Alkohol bis die rote Farbe fast verschwunden.
5. Bergamotöl, Balsam. (Kerne rot, Protoplasma gelb, Spirochäten schwarz.)

Nachweis der Spirochäten mit der Tuschemethode
(Siehe oben.)

Nachweis der Spirochäten durch vitale Färbung.
(Siehe unten.)

Färbung zum Nachweis der Negrischen Körperchen.

Methode von Mann.

1. Fixieren möglichst dünner Gewebsschnitte in Zenkerscher Flüssigkeit.
2. Wasserspülung.
3. Alkohol, Paraffineinbettung.
4. Färben der Schnitte in folgender Lösung, 12—24 Stunden:

1-proz. wäßrige Methylenblaulösung	35 ccm
1-proz. wäßrige Eosinlösung	35 ccm
Aqua dest.	100 ccm

5. Wasserspülung, Abspülen mit Alcohol absol.
6. Einlegen der Schnitte in folgende Lösung, bis Rötung derselben eintritt (ca. 10 Minuten):
   Alcohol absol. 30 ccm.
   1-proz. Lösung von Natronlauge in Alcohol absol. 5 g.
7. Abspülen in Alcohol absol.
8. Einlegen 1—2 Minuten in Wasser.
9. Einlegen 1—2 Minuten in schwach essigsaures Wasser.
10. Alcohol absol.
11. Xylol, Kanadabalsam.

Methode von Bohne[36].

1. Anfertigen von $^1/_2$—$^3/_4$ mm dicken Scheiben aus der Mitte des Ammonshornes und Einlegen in reines Aceton bei 37°, 30—45 Minuten.
2. Uebertragen in flüssig gemachtes Paraffin von 55° und 60 bis 75 Minuten bei 60° darin liegen lassen.

3. In üblicher Weise zu Schnitten verarbeiten.
4. Nach Entfernung des Paraffins $^1/_2$—4 Minuten färben mit der Mannschen Farblösung.
5. Wasserspülung.
6. Abspülen in Alcohol absol.
7. Einlegen 15—20 Sekunden in folgende Lösung:
   Alcohol absol. 30 ccm.
   1-proz. Lösung von Natronlauge in absol. Alkohol, 5 Tropfen.
8. Abspülen in Alcohol absol.
9. Uebertragen der Schnitte für 1 Minute in Wasser.
10. Nach 1—2 Minuten in mit Essigsäure leicht angesäuertes Wasser.
11. Entwässern.
12. Einbetten.

Methode von Lentz[162].

1. 2—3 mm dicke Querschnitte vom Ammonshorn in Henke-Zeller (siehe oben). Schnitte auf Objektträger antrocknen, 1 Minute in Alcohol absol. einlegen.
2. Färben mit Eosin extra B Höchst 0,5, 60-proz. Alkohol 100,0.
3. Wasserspülen.
4. Färben 1 Minute in folgender Lösung:

Gesättigte alk. Lösung von Methylenblau B.-Patent Höchst	30,0
0,01-proz. Kalilauge	100,0

5. Wasserspülung, Trocknen mit Fließpapier.
6. Differenzieren in alkal. Alkohol (Alcohol absol. 30,0 + 5 Tropfen 1-proz. Lösung von Natr. caust. in Alcohol absol.) bis zu blaßrosa Färbung.
7. Differenzieren in Alkohol absol. 30,0 + 1 Tropfen 50-proz. Essigsäure, bis Ganglienzellenzüge nur noch als schwachblaue Linien erscheinen.
8. Spülung in Alcohol. absol., Xylol usw.

(Negrische Körperchen karmoisinrot, ihre Innenkörperchen blau, Ganglienzellen nebst Kernen hellblau, ihre Kernkörperchen schwarzblau, Erythrocyten zinnoberrot.)

Oder:

1. Zerquetschen von Ganglienzellen (aus frischem Ammonshornquerschnitt) zwischen zwei Objektträgern.
2. Fixieren der noch feuchten Ausstriche einige Minuten in Methylalkohol.
3. Abspülen in Alcohol absol.
4. Färben wie oben angegeben.

Methode von Neri[205].

1. Behandeln der Schnitte (Herstellung nach Henke und Zeller) oder Ausstriche (Fixierung in absol. Alkohol) 10 Minuten mit folgender Lösung:

Eosin B (Grübler)	1,0 g
Jod	0,1 g
Jodkali	2,2 g
Destilliertes Wasser	100 ccm

2. Waschen in destilliertem Wasser.
3. Färben 5 Minuten mit 0,1-proz. wäßriger Methylenblaulösung.
4. Mit destilliertem Wasser waschen.
5. Differenzieren in 95-proz. Alkohol; Entwässern, Aufhellen, Einbetten.

Methode nach van Gieson[96].

1. Ein etwa $^1/_2$-erbsengroßes Stück grauer Nervensubstanz wird auf Objektträger gebracht und mit Deckglas zerquetscht, das Deckgläschen wird dann langsam längs über den Objektträger gestrichen.
2. Lufttrocken werden lassen oder für einige Sekunden in Methylalkohol fixieren.
3. Färben unter Erwärmen bis zur Dampfbildung mit folgender Farblösung 1—2 Minuten:

Gesättigte alkohol. Lösung von Rosanilinviolett	2 Tropfen
Gesättigte wäßrige Lösung von Methylenblau	1 Tropfen
Aq. dest.	10 Tropfen

4. Wasserspülung, Trocknen.

(Negrische Körperchen intensiv rot, Chromatinkörnchen blau.)

Maresch stellt die feinere Struktur der Negrischen Körperchen mit der Bielschowskyschen Silberimprägnierungsmethode fest.

Die vitale Färbung.

Eine Methode, die in gewissem Sinne die Mitte einnimmt zwischen der Betrachtung der Bakterien im hängenden Tropfen und dem fixierten Präparat, ist die Methode der vitalen Färbung. Da die verschiedenen Elemente des Bakterienleibes sich verschieden schnell und in verschiedenem Intensitätsgrad tingieren, so treten Details der Bakterienstruktur deutlich zutage. Täuschungen durch Kunstprodukte sind bei dieser schonenden Methode zudem weit weniger zu befürchten als bei dem gewöhnlichen Färbeverfahren mit der voraufgehenden eingreifenden Fixation.

Die Methode dürfte daher berufen sein, die in vielen Punkten noch dunklen Strukturverhältnisse des Bakterienkörpers zu klären. Man kann auf diese Weise die Bakterien lebend färben, doch ist es in vielen Fällen zweckmäßiger, sie vorher mit Formalindämpfen abzutöten.

Nakanishi[198] führt sie in folgender Weise aus: Er bestreicht gut gereinigte Objektträger mit einer in der Wärme gesättigten, wäßrigen Methylenblaulösung (B B Höchst) und wischt sie wieder ab, bis das Glas eine himmelblaue Farbe angenommen hat oder er übergießt den Objektträger mit siedend heißer Methylenblaulösung und wischt ihn nach dem Trocknen mit einem Tuch ab, bis der gewünschte Farbenton erreicht ist. Er bringt dann Tröpfchen von einer Bakterienemulsion auf Deckgläser und legt sie auf den gefärbten Objektträger. Alle Bakterien nehmen nach dieser Methode die Farbe sehr gut an, sogar säurefeste.

Ernst[69 u. 70] bringt eine Spur des Bakterienmaterials mit einem Tröpfchen Wasser auf ein Deckglas und legt darauf ein dünnes Holundermarkblättchen, an dessen Rand ein Körnchen des Farbstoffes (Methylenblau oder Neutralrot) plaziert wird. Das Deckglas wird umgekehrt auf einen hohl geschliffenen Objektträger nach Art eines hängenden Tropfens aufgelegt. Soll die Wirkung beider Farbstoffe

gleichzeitig untersucht werden, so werden Farbpartikelchen an entgegengesetzten Enden des Holundermarkblättchens lokalisiert.

Kral[148] hat zur Differenzierung des Zellinhaltes die Ernstsche Vitalfärbung mit Neutralrot und die Glykogenreaktion mittels Lugolscher Lösung angewendet: Bringt man Bakterien in Wasser auf das Deckglas und fügt ein kleines Tröpfchen Jodjodkaliumlösung zu, so weisen sie in ihren einzelnen Zellbestandteilen je nach der Beschaffenheit derselben die gelbe Eiweiß- eventuell auch die braunrote Glykogen- und die blaue Granulosereaktion auf. Neben Neutralrot gebraucht er zur Vitalfärbung auch Methylenblau, Safranin und Thionin.

Amato[3] empfiehlt zum Färben der Bakterien das Brillantkresylblau und verfährt in folgender Weise: Auf einem Objektträger breitet man eine dünne Schicht einer alkoholischen Lösung des genannten Farbstoffs aus, läßt den Alkohol abdunsten und bringt dann auf dieselbe Stelle einen Tropfen aus der Bouillonkultur oder einen Tropfen steriler Bouillon, in den man das zur Untersuchung bestimmte Bakterienmaterial einträgt. Pappenheim[117a u. b] empfiehlt Toluidinblau in alkoholischer Lösung.

Färbung der Gonokokken im lebenden Zustand erreichte Uhma[292] auf die Weise, daß er auf dem Objektträger $^1/_2$ bis 1-proz. alkoholische Lösung von Farbstoffen auftrocknen ließ und ein mit einem Eitertropfen beschicktes Deckgläschen auflegte. Plato[223] verfuhr so, daß er einen Tropfen des zu untersuchenden Eiters mit einer Oese einer Neutralrotlösung (1 ccm einer kalten, gesättigten, wäßrigen Neutralrotlösung auf 100 physiologischer Kochsalzlösung) mischte. Untersuchung im hängenden Tropfen. Die Gonokokken färben sich leuchtend rot und treten deutlich in den wenig oder gar nicht gefärbten Zellen hervor.

Methode von Ruzicka[245].

1. 0,5-proz. Lösungen von Neutralrot und Methylenblau (med. Höchst) in Aq. dest. zu gleichen Teilen mischen.
2. Hiervon auf gut gereinigte Objektträger auftropfen.
3. Bei 35 Grad im Thermostaten verdampfen lassen.
4. Auf die zurückbleibende gleichmäßige Farbschicht die zu untersuchenden Objekte in ihrem normalen Medium bringen und sie mit Deckglas bedecken. (Lebende Substanz rot, tote blau.)

Vay[296] verwendet zur Darstellung feinerer Strukturverhältnisse der Bakterien farbehaltige Nährböden (Dahlia, Pfahlblau). — In den Bakterien treten nach gewisser Zeit korpuskuläre Elemente auf, die eine besondere Neigung zu den Farbstoffen haben, und diese in sich aufnehmen.

Eine Doppelfärbung lebender und toter Bakterien erreicht Proca[229] mit folgender Mischung (siehe auch oben Lepra-bacillen, ferner vitale Färbung nach Ruzicka):

Fuchsin (Ziehl)	8 ccm
Dest. Wasser	100 „
Löfflers Blau (besser alt)	100 „

(vor dem Gebrauch mindestens 24 Stunden der Luftwirkung aussetzen). Färben 1 Minute, Wasserspülung. (Lebende Bakterien blau, tote rot.)

Vitale Färbung der Spirochaete pallida nach Mandelbaum[178].

1. Von dem zu untersuchenden Material einen hängenden Tropfen anfertigen.
2. Mit der Platinnadel etwas Löfflersches Methylenblau zusetzen und mischen.
3. Eine Oese $^1/_{10}$ Normalnatronlauge zufügen. (Die Spirochaete pallida findet sich besonders am Rande des Tropfens und ist blaßblau gefärbt, alle übrigen Spirochäten sind intensiv gefärbt.)

Vitale Färbung der Spirochaete pallida nach Meirowsky[182].

1. Aus Methylviolett Grübler oder Kristallviolett und einigen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung einen Farbbrei herstellen.
2. Diesen in einem ulzerierenden Primäraffekt verreiben. Das hierbei erhaltene Reizserum untersuchen. (Spirochäte violett, die Blutkörperchen mit tiefblauviolettem Rand.)

Literatur zum II. Kapitel.

1. Abel, Bakteriol. Taschenbuch.
2. Abe, Nakao, Arch. f. Hyg., Bd. 67, H. 4.
3. Amato, A., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 48, H. 4, **1908**.
4. Arndt, C., Münch. med. Wochenschr., **1909**, Nr. 43.
5. Arning, E. & Lewandowsky, Deutsche med. Wochenschr., **1909**, Nr. 28.
6. Aronson, Berl. klin. Wochenschr., **1910**, Nr. 35.
7. Assmann, Münch. med. Wochenschr., **1906**, Nr. 28.
8. — ebd., **1909**, Nr. 13.
8a. Aujeszky, Centralbl. f. Bakt., Bd. 23.
9. Bandi & Simonelli, Münch. med. Wochenschr., **1905**, No. 35.
10. — — Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, H. 1, **1906**.
11. Babes, Virch. Arch., **1887**.
12. Barannikoff, J., Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, H. 2, **1909**.
13. Baumgarten, Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk., Bd. 1, **1884**.
14. Beitzke, H., Berl. klin. Wochenschr., **1910**, Nr. 31.
15. Behrens, Kossel & Schiefferdecker, Die Gewebe des menschlichen Körpers, Braunschweig **1889**.
16. Berger, Karl, Centralbl. f. Bakt., Bd. 53, **1910**.
17. — Münch. med. Wochenschr., **1906**, No. 18.
18. — ebd., **1906**, No. 25.
19. Berg, Deutsch. med. Wochenschr., **1910**, Nr. 20.
20. Berka, Centralbl. f. Bakt., Bd. 49 u. 50, **1909**.
21. — ebd., Bd. 51, **1909**.
22. Bernhardt, G., Deutsche med. Wochenschr., **1909**, No. 33.
23. Bertarelli, Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, H. 4, **1906**.
24. — ebd., Bd. 41, H. 1, **1906**.
25. Bertarelli & Volpino, ebd., Bd. 41, H. 1, **1906**.
26. — — ebd., Bd. 51, **1909**.
27. Bertarelli, Volpino & Bovero, ebd., Bd. 40, H. 1, **1906**.
28. Betegh, v., ebd., Bd. 47, H. 5, **1908**.
29. — ebd., Bd. 49, H. 2, **1909**.
30. — ebd., Bd. 52, H. 4, **1909**.
31. Biedert, Hyg. Rundsch., Bd. 15, **1905**.
32. Bierotte, E., Berl. klin. Wochenschr., **1910**, Nr. 19.
33. Blochmann, F., Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk., Bd. 1, **1884**.
34. Blumenthal & Lipskerow, Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, H. 3, **1905**.
35. Bogason, Hospitalstidende, **1909**, Nr. 47; ref. Münch. med. Wochenschr. **1910**, Nr. 7.
36. Bohne, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 52, **1906**.
37. Boni, Münch. med. Wochenschr., **1900**.
38. Borrel & Burnet, C. r. soc. d. biol., T. 60, **1906**.

39. Boström, Zieglers Beitr., Bd. 9.
40. — 4. Kongreß f. inn. Med., Wiesbaden 1884.
41. Böhm, A. & Davidoff, M., Lehrb. d. Histol. d. Menschen, einschl. d. mikrosk. Technik, 2. Aufl., Wiesbaden 1889.
42. Brönnum, A., Hospitalstidende, 1905, Nr. 21.
43. Brunk, A., Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 52.
44. Buchner, Aerztl. Intelligenzbl., 1884.
45. Buerger, Leo, Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, H. 2 u. 3, 1905.
46 Bunge, Fortschr. Med., 1894.
47. Burri, Das Tuscheverfahren (G. Fischer), Jena 1909.
48. Caan, Albert, Centralbl. f. Bakt., Bd. 59, H. 5, 1911.
49. Chiari, Unterelsässischer Aerzteverein zu Straßburg, 30. Okt. 1909.
50. Ciechanowski, Stanislaw, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, H. 3, 1903.
51. Claudius, Annales Pasteur, T. 11, 1897.
52. Czaplewsky, Die Untersuchung des Auswurfes auf Tuberkelbacillen, Jena 1891.
53. — Hyg. Rundschau, Bd. 4, 1894.
54. Davidsohn, Berl. klin. Wochenschr., 1905.
55. Dohi, Sh., Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, H. 3, 1907.
56. Dorset, Rep. and papers of the American Public Health. Assoc., Vol. 24.
57. Dreyer, Hyg. Rundsch., Nr. 21.
58. Dudgeon, S., Lancet, Aug. 1905.
59. Ehrlich, P., Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 1, 1880.
60. — Deutsche med. Wochenschr., 1882.
61. — Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes, I. Teil, 1891.
62. Ehrlich, H. & Lemartowicz, Wien. med. Wochenschr., 1908, Nr. 18.
63. Eisenberg, Ph., Centralbl. f. Bakt., Bd. 53 u. 56.
64. — ebd., Bd. 48, 1909.
65. — Berl. klin. Wochensehr., 1910, Nr. 8.
66. Ellermann & Erlandsen, Hospitalstidende, 1908, Nr. 30.
67. — — Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 61, H 2, 1908.
68. van Ermengem, Centralbl. f. Bakt. (Ref.), Bd. 15, 1894.
69. Ernst, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 4, 1888.
70. — Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 8, Nr. 1, 1902.
71. Ficker, Hyg. Rundsch., Bd. 12, 1902.
72. Fiocca, Centralbl. f. Bakt., Bd. 14, 1893.
73. Fontes, A., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 49, H. 3, 1909.
74. Forest, M., ebd., Bd. 42, 1906.
75. Fränkel, Berl. klin. Wochenschr., 1884.
76. Friedländer, Fortschr. Med., Bd. 3, 1884.
77. — Mikrosk. Technik, herausg. von Eberth, Berlin 1900.
78. Frühwald, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 49.
79. Fuchs-Wolfring, Beitr. z. Klinik d. Tuberkulose, Bd. 10.
80. Gasis, D., Centralbl. f. Bakt., Bd. 50. H. 1, 1909.
81. — Berl. klin. Wochenschr., 1909. Nr. 18.
82. — ebd., 1910, Nr. 31.
83. Gatti, Il policlinico, 14. Aug. 1910.
84. Geipel, Gesellsch. f. Natur- u. Heilk. in Dresden, 13. Febr. 1909.
85. Gemelli, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, H. 4, 1903.
86. Geth, F., Pharmazeutische Vierteljahrsrundschau, 1910.
87. Giemsa, G., Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, H. 2, 1904.
88. — Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 26.
89. — ebd., 1907, Nr. 17.
90. — ebd., 1909, Nr. 40.
91. — Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 47.
92. — Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 12.
93. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 54, H. 5, 1910.
94. Gins, A., ebd., Bd. 52, H. 5, 1909.
95. — Bd. 57, H. 5, 1911.
96. Gierke, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 9.
97. Gieson, van, Centralbl. f. Bakt., Bd. 43, H. 2, 1907.
98. Görres, H., Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 70.
99. Goldhorn, Proc. of the N. Y. path. soc., 1905; Journ. of exper. med., 1906.
100. Gottberg, Arch. f. Hyg., Bd. 65, 1908.
101. Gram, Fortschr. Med., Bd. 2, 1884.
102. Günther, Deutsche med. Wochenschr., 1887, Nr. 22.

103. Gueyrat & Ioltrain, Soc. Med. d'Hopitaux, 23. Juni 1905.
104. Hall, H., Inaug.-Diss. Gießen, 1909.
105. Hamm, A., Centralbl. f. Bakt., Bd. 43, H. 3, 1907.
106. Hammerl, H., Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 38.
107. Harris, Centralbl. f. Bakt., Bd. 34, H. 2, 1903.
108. Haserodt, H., Hyg. Rundschau, 1909, H. 12.
109. Hatano, Berl. klin. Wochenschr., 1909, Nr. 37.
110. Hauser, Münch. med. Wochenschr., 1887, Nr. 34.
111. Hecht & Wilenko, Wiener klin. Wochenschr., 1909.
112. Hehewerth, Arch. f. Hyg., Bd. 39.
113. Heller, 3. Tag der fr. Vereinig. f. Mikrobiol., Juni 1909.
114. Henke, F. & Zeller, E., Centralbl. f. pathol. Anat., 1905, Nr. 1.
115. Herman, Berl. klin. Wochenschr., 1908, Nr. 14.
116. — Beiträge zur Tuberkulose, Bd. 8, 1907.
117. — Annales de l'Institut Pasteur, Jan. 1908.
118. Herxheimer, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 39.
119. Herxheimer & Hürner, Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 26.
120. Herxheimer & Opificius, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 7.
121. Herzfeld, E., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 66, H. 2, 1910.
122. Hill, H. W., Journ. of med. research, Vol. 13, Nr. 1.
123. Hoffmann, R., Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, H. 3 1908.
124. Hoffmann, E. & Beer, A., Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 22.
125. Hoffmann, E. & Halle, A., Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 31.
126. Hoffmann, E., Monatsh. f. prakt. Dermat., 1909.
127. — Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 28.
128. Hoffmann, E. & Halle, A., Münch. med. Wochenschr., 1906, S. 1516.
129. Hüne, Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 41.
130. — Hyg. Rundsch., Jahrg. 18, Nr. 18.
131. Hutzella, Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 20.
132. Israel, Virch. Arch., Bd. 105.
133. Jacobson, C. r. soc. biol., T. 67, 1909.
134. Jörgensen, G., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 66, H. 2, 1910.
135. Johne, Deutsche tierärztl. Wochenschr., 1894.
136. Kahlden, v., Technik der histologischen Untersuchungen pathol.-anat. Präparate, Jena 1898.
137. Kalb, R., Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 26.
138. Kaufmann, Hyg. Rundschau, Bd. 8, 1898.
139. Kayser, H., Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, H. 1, 1906.
140. Klein, ebd., Bd. 25, 1899.
141. Klett, Inaug.-Diss. Gießen, 1894.
142. Klose, F., Münch. med. Wochenschr., 1910, No. 3.
143. Koch, R., Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 1, 1881.
144. — ebd., Bd. 2, 1884.
145. — Berl. klin. Wochenschr., 1882.
146. Kögel, H., Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 48.
147. Koslow, Berl. klin. Wochenschr., 1910, Nr. 25.
148. Kral, Verh. deutsch. Naturf. u. Aerzte, 74. Vers., 1902.
149. Kraus, A., Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 52.
150. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, H. 1, 1907.
151. v. Krogh, Mentz Centralbl. f. Bakt., Bd. 58, H. 1, 1911.
152. Kronberger, H., Beitr. z. Klinik der Tuberkulose, Bd. 16, H. 2, 1910.
153. Krüger, Biol. Abt. d. ärztl. Vereins in Hamburg, 30. Nov. 1909.
154. Kühne. Praktische Anleitung z. mikrosk. Nachweis der Bakterien im tierischen Gewebe, Leipzig 1888.
155. — Fort. Med., Bd. 6, 1888.
156. — Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.
157. Kutscher, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 18, 1894.
158. Lagrèze, B., Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 2.
159. Lange, L. & Nitsche, ebd., 1909, Nr. 10.
160. Lee, A. B. & Mayer, P., Grundzüge der mikroskop. Technik f. Zoologie u. Anat., Berlin 1898.
161. Lenartowicz & Potrzobowski, Centralbl. f. Bakt., Bd. 56, 2, 1910.
162. Lentz, O., Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, H. 4, 1907.
163. Levaditi & Mauonélian, Compt. med. soc. biol. à Paris, 25. Nov. 1905, Bd. 59.
164. Levaditi, Ann. de l'institut Pasteur, 1906, Januar.
165. Levy, M., Centralbl. f. Bakt., Bd. 55, Nr. 3, 1910.

166. Leszcynski, R. v., Arch. f. Dermat. u. Syph., Bd. 71, 1904.
167. Liebermeister, G., Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 28.
168. Lier, W., Centralbl. f. Bakt., Bd. 51, H. 6, 1909.
169. Lippmann, A., Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 43.
170. Loeffler, Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 31, 1907, Nr. 5.
171. — ebd., 1910, Nr. 43.
172. — Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1889, u. Bd. 7, 1890.
173. — Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 2, 1884.
174. London, Arch. of sc. biol., Vol. 6.
175. Lorenz, Berl. klin. Wochenschr., 1911.
176. Lubarsch, Deutsche med. Wochenschr., 1903, Nr. 8.
177. Maier, F., Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 12.
178. Mandelbaum, ebd., 1907, Nr. 46.
179. Manicatide, C. r. soc. biol., T. 65, 1908.
180. Maresch, R., Wien. klin. Wochenschr., 1905, Nr. 25.
181. May-Grünwald, Centralbl. f. inn. Med., 1902.
182. Meirowsky, Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 27.
183. Mende, ebd., 1910, Nr. 25.
184. Merkel, H., ebd., 1910, Nr. 13.
185. Meyer, A., Flora, Bd. 97, H. 3, 1908 (zit. nach Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., Bd. 25).
186. — Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 24, Nr. 6, 1904.
187. Michaelis, L., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 29, 1901.
188. Michaelides, Beitr. zur Klinik der Tuberkulose, Bd. 8, H. 1.
189. Miller, Centralbl. f. Bakt., Bd. 15, 1894.
190. Möller, ebd., Bd. 10, 1891.
191. Much, H., Beitr. z. Klinik d. Tuberkulose, Bd. 8, H. 1.
192. — ebd., Bd. 11, H. 1.
193. — Berl. klin. Wochenschr., 1908, Nr. 14.
194. Mühlens, P., Centralbl. f. Bakt., Bd. 43, H. 6 u. 7, 1907.
195. Müller, A., ebd., Bd. 29, 1901.
196. Mulzer, Praktische Anleitung zur Syphilisdiagnose auf biologischem Wege (Verl. J. Springer), 1910.
197. Münch, W., Korr.-Bl. f. Schweizer Aerzte, 40. Jahrg., Nr. 6.
198. Nakanischi, Münch. med. Wochenschr., 1900, No. 6.
199. Nebel, A., Arch. f. Hyg., Bd. 47, H. 1, 1903.
200. Neelsen, Deutsche med. Wochenschr., 1883.
201. Negri, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 43 u. 44.
202. Neisser, A., Zeitschr. f. Hyg., Bd. 4, 1889.
203. Neisser, M., ebd., Bd. 24, 1897.
204. — Hyg. Rundschau, 1903, Nr. 14.
205. Neri, F., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 50, H. 3, 1909.
206. Neumann, A., Centralbl. f. Bakt., Bd. 43, Nr. 7, 1907.
207. Neumann, R. O., Naturhist.-med. Verein Heidelberg, 25. Juli 1905.
208. Nicolas, Favre & André, Lyon. méd., 1905.
209. Nicolle, Ann. Pasteur, Vol. 9, 1895.
210. Nikoforoff, Wratsch 1887; ref. Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk., Bd. 5, 1888.
211. Nocht, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 24, 1898, u. Bd. 25, 1899.
212. Noeggerath & Staehelin, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 31.
213. Ogawa, M., Mitteil. d. med. Gesellsch. zu Tokio, Bd. 17, Nr. 22, 1903; Ref. im Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 36, 1905.
214. Olt, Deutsche tierärztl. Wochenschr., 1899, Nr. 1.
215. Oppenheim, M. & Sachs, Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 29.
216. Orszag, O., Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, H. 3, 1906.
217. Pappenheim, A., Grundriß der Farbchemie, Berlin 1901.
217a. — Monatsh. f. prakt. Dermatol., 1903, Bd. 37.
217b. — Virch. Arch., Bd. 157.
218. Peppler, Centralbl. f. Bakt., Bd. 29, 1901.
219. Peters, Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 9.
220. Pick & Jakobsohn, Berl. klin. Wochenschr., 1896.
221. Picker, Wien. klin. Wochenschr., 1906, Nr. 43.
222. Piorkowsky, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 29, 1901.
223. Plato, Berl. klin. Wochenschr., 1899, Nr. 49.
224. Plaut, Biol. Abt. d. ärztl. Vereins zu Hamburg, 19. Dez. 1905; ref. Münch med, Wochenschr., 1906, Nr. 10.
225. — Aerztl. Verein zu Hamburg, 16. Nov. 1909; ref. Münch. med. Wochenschr. 1910. Nr. 4.

226. Ploeger, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 29.
227. Posner, C., Berl. klin. Wochenschr., 1910, Nr. 3.
228. Preis, Wien. med. Presse, 1907, Nr. 49.
229. Proca, G., C. r. soc. de biol., T. 67, 1909.
230. Proca & Vasilescu, Rivesta stintelor medicale, Juni 1905.
231. Reitmann, K., Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 25.
232. Reuter, Biol. Abt. d. ärztl. Vereins Hamburg, 19. Dez. 1905.
233. — Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 30, 1901.
234. Ribbert, Deutsche med. Wochenschr., 1885.
235. Riebes, W., Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 31.
236. Rille, ebd., 1905, Nr. 29.
237. Romanowsky, Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria, Petersburg 1891.
238. Rosenberger, Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, H. 3, 1909.
239. Rosenblat, St., Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 49.
240. Rosenhauer, Biol. Abt. d. ärztl. Vereins zu Hamburg, 6. Juli 1909.
241. Rossi, G. de, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, 7, 1903.
242. Ruge, Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, H. 5, 1908.
243. Russ, The Royal Soc., 24. Juni 1909.
244. Russow, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 18.
245. Ruzicka, V., Pflügers Arch., Bd. 107.
246. Saathoff, Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 51.
247. Sabolotny, D., Russky Wratsch, 1905, Nr. 23.
248. Sachs-Müke, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 34 u. Nr. 50.
249. — — Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 7.
250. Sangiorgi, Pathologica, Vol. 2, Nr. 34, 1910.
251. Schaudinn, F. & Hoffmann, E., Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 22, H. 2, 1905.
252. Schaudinn, F., Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 42.
253. Schereschewsky, J., Deutsch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 12.
254. — ebd., 1909, No. 29.
255. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, H. 1, 1908.
256. Scheven, v., Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 37.
257. Schieferdecker, Arch. f. Anat. u. phys. Anat., I. Abt., 1882.
258. Schilling, Centralbl. f. Bakt., Bd. 58, Nr. 3, 1911.
259. Schmorl, G., Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 22.
260. — Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden, Leipzig 1897.
261. Schnitter, Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 36.
262. Scholz, ebd., 1905, Nr. 11.
263. Schüffner, Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 28.
264. Schultz, E., Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 36.
265. Seemann, O., Berl. klin. Wochenschr, 1809, Nr. 14.
266. Simonelli & Bandi, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, H. 1, 1906.
267. Simmonds, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 27.
268. Skutetzky, Wien. med. Wochenschr., 1910, Nr. 35.
269. Smith, Brit. med. Journ., 1901.
270. — E. F. Washington D. C., 1905.
271. Sobernheim, G. & Tomasczewski, E., Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 39.
272. Sommerfeld, P., Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 11.
273. Sorgo, Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 13.
274. Spengeler, K., Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 9.
275. Spiegel, O., Centralbl. f. Bakt., Bd 40, H. 3, 1906.
276. Stephan, S., ebd., Bd. 51, H. 1, 1909.
277. Stephensen, Lancet 1889.
278. Stern, M., Berl. klin. Wochenschr., 1907, Nr. 14.
279. Sticker, G., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 43, 1907.
280. Stöhr, Ph., Lehrb. d. Histol., Jena 1898.
281. Suess, Wien. klin. Wochenschr., 1907, Nr. 34.
282. Thesing, E., Arch. f. Hyg., Bd. 50.
283. Thilenius, O., Berl. klin. Wochenschr., 1909, Nr. 25.
284. Trincas, L., Soc. delle sc. med. e natur. di Cagliari 1907; ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 41, Nr. 7/10, 1908.
285. Trinchese, J., Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 11.
286. Uhlenhuth, Berl. klin. Wochenschr., 1908, Nr. 29.
287. Uhlenhuth, 2. Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie, 1908.
288. — Versamml. deutscher Tuberkulosearzte in Berlin, Mai 1909.
289. Uhlenhuth & Kersten, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie, Bd. 6, H. 3.

290. Uhlenhuth & Xylander, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt., Bd. 32, H. 1, 1909.
291. — — Berl. klin. Wochenschr., 1908, Nr. 29.
292. Uhma, Arch. f. Dermat., Bd. 50, H. 2.
293. Unna, Centralbl. f. Bakt., Bd. 3, 1888.
294. — Biol. Abt. d. ärztl. Vereinig. z. Hamburg, 5. Nov. 1907.
295. Valenti, G. L., Sitz. d. naturw. Sekt. d. K. Akad. zu Modena, 30. Juni 1902, Orig.-Ref. Centralbl. f. Bakt., Bd. 32, Nr. 24, 1902.
296. Vay, Centralbl. f. Bakt., Bd. 52, 1909, u. Bd. 55, 3, 1910.
297. Versé, Med. Gesellsch. Leipzig, 15. Mai 1906.
298. Vincent, M. H., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 16, 1894.
299. Vogt, E., Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 36.
300. Wahl, A. v., Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, H. 3, 1903.
301. Weichselbaum, Grundriß d. pathol. Histol., Wien 1892.
302. Weidenreich, Fol. haemat., Vol. 3, 1906.
303. Weigert, Sitz.-Ber. d. schles. Gesellsch. f. vaterländ. Kultur, 10. Dez. 1875.
304. — Virch. Arch., Bd. 84, 1881.
305. — Fortschr. Med., Bd. 5, 1887.
306. Weiss, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 9.
307. — Berl. klin. Wochenschr., 1909, Nr. 9.
308. — Berl. klin. Wochenschr., 1909, Nr. 40.
309. Webke, Arch. f. klin. Chir., Bd. 59, 1899.
310. v. Wendt, G., Centralbl. f. Bakt,. Orig., Bd. 31, Nr. 13, 1902.
311. Whitney, W. F., Boston med. and surg. journ., 1903, May 7.
312. v. Winkler, H., Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 39, 1905.
313. Wirtz, M., Beitr. z. Klinik d. Tuberkulose, Bd. 11, H. 1.
314. Wirtz, R., Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, H. 8, 1908.
315. Yamamoto, Y., ebd., Bd. 47, H. 5, 1908.
316. Zahn, Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 16.
317. Zettnow, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 30, 1899.
318. Ziehl, Deutsch. med. Wochenschr., 1882.
319. Zieler, K., Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat., Bd. 14.
320. Ziemann, Centralbl. f. Bakt., Bd. 24, 1898.

Kapitel III.

Die Methoden der Bakterienzüchtung.

Die Züchtung der Bakterien auf künstlichen Nährböden ermöglicht es einerseits, die Bakterien, losgelöst von den Verhältnissen ihres natürlichen Vorkommens, jederzeit für die Bedingungen des Versuchs zur Hand zu haben.

Ein weiterer Vorteil der künstlichen Züchtung beruht darin, daß die Verschiedenartigkeit des Wachstums oder auch der Nachweis der Bildung gewisser Umsetzungsprodukte der Bakterien in den Nährböden uns die Bestimmung morphologisch und färberisch sich gleich verhaltender Arten möglich machen.

Der Hauptwert der künstlichen Züchtung und namentlich der künstlichen Züchtung auf *festen* Nährböden beruht aber darauf, daß durch sie die Trennung der einzelnen Arten eines Bakteriengemischs und damit die Isolierung von Bakterien in Reinkulturen sich ausführen läßt.

Ehe die zu diesem Zweck bestehenden Methoden besprochen werden, sei die Darstellung der Nährböden erörtert.

Darstellung der Nährböden.

1. Die Apparate zur Sterilisation und die Verfahren der Sterilisierung der Glasgefäße und Nährböden.

Da, wie erwähnt, bei der künstlichen Züchtung die Gewinnung von Reinkulturen in erster Linie bezweckt ist, so ist es nötig, daß sowohl das Nährmaterial wie die Gefäße, in denen es aufbewahrt wird, selbst keimfrei sind.

Zur Sterilisation der Glasgefäße verwendet man die Trockenhitze, die Sterilisation der Nährmedien erfolgt i. R. im strömenden Dampf bei 100° oder im gespannten Dampf im Autoklaven bei etwa 110° bis 120°.

a) Sterilisation der Glasgefäße.

Der Heißluftsterilisator zur Sterilisation der Glasgefäße besteht aus einem doppelwandigen Schrank aus Eisenblech mit Tür und Tubus mit durchbohrtem Korkstopfen zum Einstecken eines Thermometers.

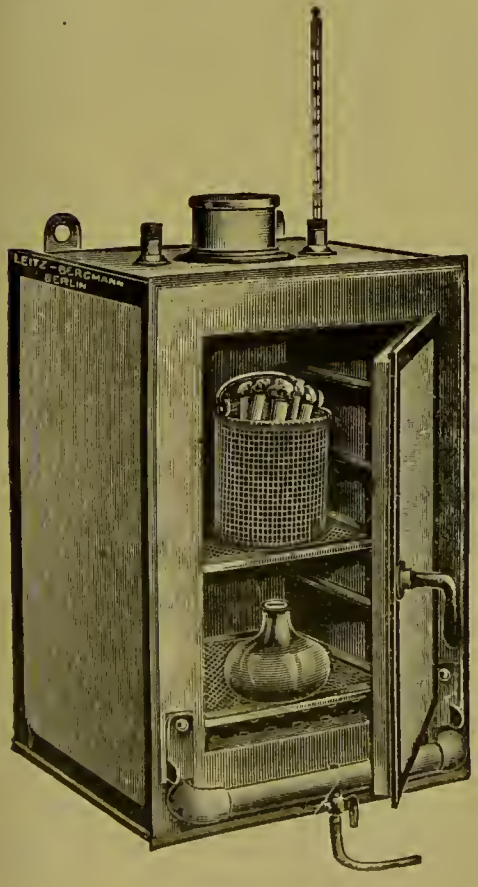


Fig. 47.

Die neueren Heißluftsterilisatoren sind mit Regenerations-Gasheizvorrichtung ausgestattet und mit dreifacher Wandung versehen. Die Heizgase kommen bei diesen Apparaten nicht mit den zu sterilisierenden Objekten in Berührung (Fig. 47).

Flaschen, Reagenzgläser, Kolben werden, nachdem sie sorgfältig gereinigt und getrocknet sind, vor der Sterilisation an der Mündung mit einem Wattebausch verschlossen.

Fig. 48.

Um auch eine Verunreinigung der Mündungsstelle zu vermeiden, kann man noch eine Glasschale (Hälfte der Esmarchschälchen, s. u.)

überstülpen. Pasteur hat besondere Kolben konstruiert, auf deren Hals ein helmartiger Aufsatz angeschliffen ist (Fig. 48), der an seinem oberen Ende offen ist und mit Watte verschlossen wird. Auf diese Weise bleibt der Rand des Kolbens sicher keimfrei. Entsprechend konstruierte Reagenzgläser, bei denen der Helm zum Luftzutritt mit einer feinen Oeffnung versehen ist, dienen speziell zur Züchtung von langsam wachsenden Bakterien, z. B. Tuberkelbacillen.

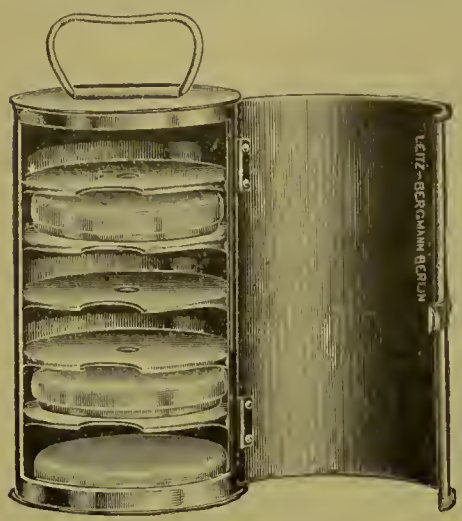


Fig. 49.

Die mit Watteverschluß versehenen Gefäße werden in verzinkten Drahtkörben in den Heißluftsterilisator auf einen nahe dem Boden befindlichen, herausnehmbaren, durchlochten Einsatz gestellt und mindestens eine halbe Stunde lang einer Temperatur von 160° ausgesetzt, wobei sich die Watte leicht bräunt. Platten und Pipetten werden in besonderen Blechbüchsen sterilisiert (Fig. 49, 50).

(Gummigegenstände [Pfropfen und Schläuche] vertragen weder trockene Hitze noch Sterilisation im Dampf. Sie werden mit Wasser und Seife gewaschen, in Wasser gespült und ca. 1 Stunde in 1-prom. Sublimatlösung eingelegt und vor dem Gebrauch mit sterilem Wasser abgewaschen.)

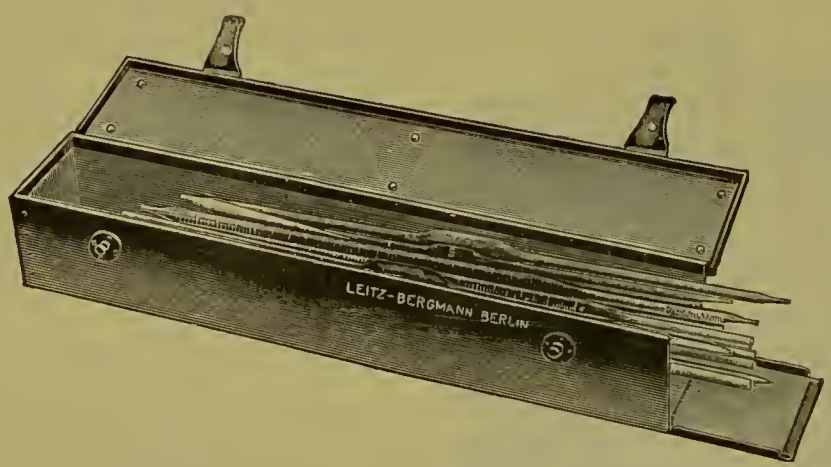


Fig. 50.

b) Sterilisation der Nährböden.

Die Sterilisation der Nährböden erfolgt im strömenden Dampf in einem von R. Koch angegebenen Apparat. Er besteht aus einem kupfernen, von unten anzuheizenden Wasserreservoir mit Wasserstandsrohr und Regulator für den Wasserzufluß. Dieser Topf geht über in einen doppelten Mantel, der von einem schlechten Wärmeleiter (meist wird besonders präpariertes Linoleum verwandt) umgeben ist. Den Verschluß bildet ein lose aufsitzender, abnehmbarer

Deckel mit einer Oeffnung zum Einfügen eines Thermometers. Sobald die Temperatur im Innern des Apparats auf 100° gestiegen ist, stellt man in einem Drahtkorbe von oben die zu sterilisierenden, in vorher im Trockenschrank sterilisierte Glasgefäße gefüllten Nährmedien auf einem über dem Wasserbehälter befindlichen Rost in den Dampftopf hinein. Am zweckmäßigsten ist es nach Petri, den Dampf von oben in den Apparat einströmen zu lassen, wodurch die kältere, schwerere Luft schneller ausgetrieben wird. Der von Praussnitz [223–225] angegebene Dampfsterilisierapparat eignet sich besonders zur Sterilisation von Gegenständen mit größerer Grundfläche. Da wo Dampfheizanlage vorhanden ist, kann man durch Einleiten des Dampfes in ein entsprechendes Gefäß die Sterilisation direkt vornehmen.

Ein Apparat, der gleichzeitig als Dampfkochtopf und als Autoklav benutzt werden kann, ist von Abba [1] angegeben. Er gestattet allerdings nur einen Ueberdruck von $^1/_2$ Atmosphäre, was aber für die meisten bakteriologischen Zwecke ausreichend sein dürfte. Er besteht aus einem gewöhnlichen Sterilisator, nur ist der Deckel mittels Flügelschrauben dampfdicht aufzuschrauben. Im Deckel befindet sich ein Thermometer, ein Sicherheitsventil und ein Luftauslaßhahn. Soll der Apparat als Autoklav benutzt werden, so wird einfach der Deckel fest geschlossen und nach Entweichen der Luft auch der Lufthahn.

Auf dem gleichen Prinzip beruht der neue Kochsche Dampftopf (Lautenschläger) mit Ueberdruck, der eine Temperatur von 103–104° C zu erzeugen gestattet (Fig. 51). Mit dem Wasserraum des Apparates steht durch ein Rohr *R* ein zylindrisches Gefäß *C* in Verbindung, in diesem befindet sich der Einsatz *D*, in den durch Abschrauben des Oberteils *A* ungefähr 20 ccm Quecksilber eingefüllt werden. Das Rohr *S* taucht in das Quecksilber ein und ist mit der Gaskammer *A* verbunden. Das Gas tritt in der Pfeilrichtung ein und strömt zum Brenner *B*. Der Deckel des Apparates wird mittels Flügelmuttern gegen die äußere Atmosphäre abgeschlossen. Der oben angebrachte Hahn *H* dient zum Ablassen der Luft. Thermo-

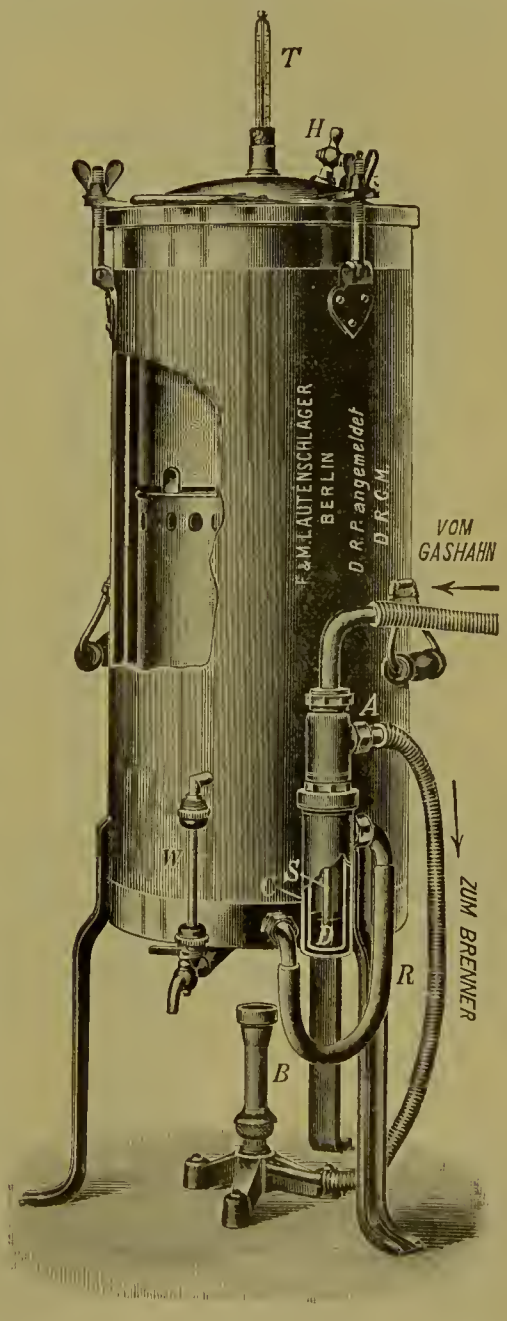


Fig. 51.

meter *T* zur Temperatur-, das Rohr *W* zur Wasserstandkontrolle. Sobald der Ueberdruck entsteht, wird dieser durch die Flüssigkeit auf das Quecksilber übertragen, das im Rohr *S* hochsteigt. Ist der höchste Stand erreicht, dann entspricht die Drucksäule einer Temperatur von 103—104° C. Das Quecksilber sperrt nun die Gaszufuhr bis auf eine Flammengröße ab, die zur Erhaltung der Temperatur bezw. des Druckes ausreicht.

Da viele Nährböden keine allzulange Sterilisation bei hoher Temperatur vertragen, so wird die Sterilisation fraktioniert nach Tyndall vorgenommen, indem die zu sterilisierenden Objekte an drei aufeinander folgenden Tagen je eine halbe Stunde in den Dampf kommen. Bei dieser Art der Sterilisation werden die vegetativen Formen der Bakterien bereits am ersten Tag vernichtet. Die widerstandsfähigen Sporen keimen bis zum nächsten Tag aus und werden dann bei der abermaligen Dampfeinwirkung gleichfalls zerstört.

Fig. 52.

Für Substanzen, die eine höhere Temperatur als 100° vertragen, erfolgt die Sterilisation zweckmäßig in einem Autoklav. Die Erhitzung im gespannten Dampf geht natürlich schneller und sicherer vor sich als im strömenden Dampf. Der Apparat ist auf eine bestimmte Zahl von Atmosphären geeicht, mit Sicherheitsventil, Thermometer und Manometer versehen. Sobald mit dem strömenden Dampf alle Luft aus dem Apparat ausgetrieben ist, wird er sorgfältig verschlossen. Nachdem genügend lange Zeit die gewünschte Temperatur eingewirkt hat, wird der Dampf ganz allmählich abgelassen, da sonst die im Innern befindlichen, zu sterilisierenden Flüssigkeiten zum Sieden kommen und herausgeschleudert werden.

Der nebenstehende Autoklav (Lautenschläger. Fig. 52) ist für einen Druck von 2 Atmosphären = 130° bestimmt. Er ist mit einem Zentralverschluß *EH* versehen, so daß durch Drehung eines einzigen Handrades der Deckel dampfdicht auf den Apparat aufgeschraubt werden kann. Der Autoklav ist mit einem Gasregulator ausgestattet, durch den die Temperatur des Dampfes konstant auf 2 Atmosphären erhalten wird.

Um auch ohne Autoklaven Temperaturen über 100° erzeugen zu können, benutzt man Salz-, Oel- oder Paraffinbäder.

Um Flüssigkeiten ohne Anwendung von erhöhten Temperaturen zu sterilisieren, werden sie durch keimdichte Filter filtriert (deren Beschreibung siehe unten).

2. Filter für Nährböden.

Die Filtration der bei gewöhnlicher Temperatur festen, mit gelatinierenden Substanzen bereiteten Nährböden erfolgt durch ein doppeltes Faltenfilter oder auch durch entfettete Watte. Zur Erleichterung kann man die Filtration der Gelatine im strömenden Dampf vornehmen, wo die Nährböden natürlich länger flüssig bleiben und relativ schnell filtrieren.

Ferner sind zur bequemen Filtration Heißwassertrichter sehr zweckmäßig. Es sind Trichter mit umliegendem Kupfermantel, in dem sich Wasser befindet, das von außen erwärmt wird.

Von Unna[409 u. 410] ist ein besonderer Dampftrichter angegeben, bei dem man unter erhöhtem Druck filtrieren kann (Fig. 53). Er besteht aus einer kupfernen Hohlkugel mit Ventil, deren oberes Segment abhebbar ist, im Innern sitzt ein nach außen mündender Metalltrichter, der mit dem verflüssigten Nährmedium gefüllt wird; die Erhitzung erfolgt von außen. Das Wasser befindet sich zwischen äußerer Trichter- und innerer Kugelwand. Mit diesem Trichter kann man nach Unna viermal so schnell als gewöhnlich filtrieren.

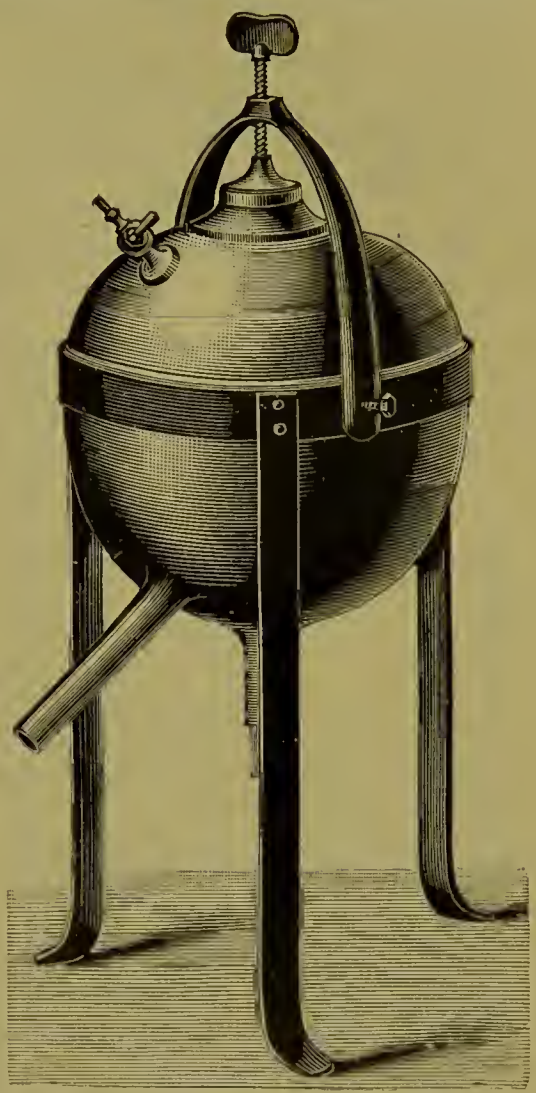


Fig. 53.

Die Filtration des Agars ist besonders schwierig. Man nimmt sie zweckmäßig im Dampftopf vor, wo der Agar lange flüssig bleibt, oder man benutzt zur Filtration den vorher beschriebenen Heißwassertrichter resp. Dampftrichter. Von Th. Paul[300–302] ist ein Sandfilterapparat für Agar angegeben worden. Bei diesem läuft die Flüssigkeit durch mehrere Schichten Sandes verschiedener Korngröße, die sich in einem Siebsatz befinden. Babucke[7] benutzt einen Zinktrichter mit 4-facher Lage entfetteter Watte, die über den Rand hinausragt und sterilisiert 1 Stunde im Dampftopf. Kaspareck[191] filtriert den Agar durch einen elektrisch geheizten Trichter, der in folgender Weise konstruiert ist: Ein Glastrichter wird von mehreren durch Wasserglas zusammengehaltenen Lagen von Asbestpapier umgeben, zwischen denen 10 m 0,3 mm starker Nickelindraht laufen. Hilger-

mann [175] umgibt den Raum, in dem sich der zu filtrierende Agar befindet, mit schlechten Wärmeleitern, wodurch keine Abkühlung des Inhaltes eintritt. v. Drigalski [83 u. 84] hat einen Schnellfilter für Agarlösungen angegeben (Firma Lautenschläger-Berlin), bei dem während des Kochens der Agarmassen in einem Kessel gleichzeitig das Sterilisieren eines zweiten über den ersten Kessel gestülpten als Filter gebauten kesselartigen Apparates, der einen Aufsatz mit durchlochtem Boden und darauf befindlichen Watteschicht trägt, stattfindet. Nach dem Kochen des Agars wird dieses in den nunmehr umgestülpten als Filter dienenden Kessel eingegossen. Bei dieser Anordnung wird Zeit und Gas gespart. Da die Einrichtung auch mit einfachem Wasserbad ohne Dampftopf anzuwenden ist, eignet sie sich besonders für fliegende Laboratorien.

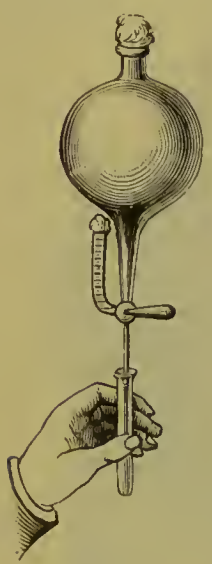


Fig. 54.

A. Fränkel [108] umging die Filtration ganz, indem er den Agar sedimentieren ließ. Haegeler [145] zentrifugierte ihn. Dominikiewicz [81] reinigte den Agar vor der Zusetzung zum Nährsubstrat mit Alkohol und ersparte dadurch die Filtration.

Das Einfüllen der fertigen Nährmedien in ein Röhrchen kann mittels gewöhnlichen Trichters geschehen, an dessen unterem Ende sich ein Stück Gummischlauch mit Quetschhahn und einem zur Spitze ausgezogenen Glasrohr befindet. Sollen abgemessene Mengen des Nährmediums in die Kulturgefäße eingefüllt werden, so bedient man sich entweder einer von Heim (Lehrb.) angegebenen Bürette, die an den vier Seiten verschiedene Maßeinteilung hat, oder des dem Schütteltrichter ähnlichen Abfülltrichters von Treskow (Fig. 54). An dem Ausflusse dieses Trichters befindet sich ein mit rechtwinkliger Bohrung versehener Hahn, von dem ein kleines Meßrohr nach oben abgeht. In dieses fließt bei der ersten Hahndrehung das Nährmaterial bis zur gewünschten Marke ein und wird bei der zweiten Drehung in ein untergehaltenes Gefäß abgeführt.

Epstein [91–93] beschreibt folgende Vorrichtung zum Abfallen steriler Flüssigkeiten. Auf einen Erlenmeyerschen Kolben ist ein gläserner Helm aufgeschliffen, der einen Ansatzstutzen mit Wattefilter zum Einblasen (z. B. durch Doppelgebläse) und eine bis auf den Boden des Erlenmeyerkolbens reichende Steigröhre trägt. Die durch Einblasen aus dem Erlenmeyerkolben in die Steigröhre hinaufgedrückte Flüssigkeit fließt aus der Steigröhre seitlich in eine angeschmolzene vertikale kleine Abfüllbürette über. Ihr Ausfluß ist durch einen in der Bürette mit Wattepfropf stehenden Glasstab verschlossen, dessen unteres Ende als Gegenventil in die Ausflußspitze der Bürette eingeschliffen ist. Die Ausflußöffnung wird von unten durch einen aufgesetzten aufgeschliffenen kleinen Helm vor Verunreinigung geschützt. Zum Luftausgleich hat er seitlich ein kleines Loch und wird zum Schutz gegen Infektion mit einer Spur Formalin benetzt.

3. Die Bereitung der Nährböden.

Die meisten Bakterien stellen an die Zusammensetzung des Nährbodens keine allzu hohen Ansprüche. Es genügt das Vorhandensein

geringer Mengen von N und C, sei es in organischer oder anorganischer Form, von Salzen und Wasser; dabei bevorzugen die meisten Arten eine schwach alkalische Reaktion des Nährmediums und bestimmte Wachstumstemperatur. Nur bei wenigen Arten bedarf es noch der Gegenwart besonderer Substanzen, um eine künstliche Züchtung zu ermöglichen.

Zur Herstellung guter Nährböden macht Hesse folgende Vorschläge:

1. Man verwende bei der Sterilisation der Nährböden nur Glas, das kein Alkali mehr abgibt. Von der Alkaliabgabe kann man sich überzeugen, indem man die Glasgefäße mit einer wassergesättigten, ätherischen Eosinlösung anfüllt, die alsbald die Wandung der Gläser je nach deren Güte weniger oder mehr rot färben wird.

2. Man bediene sich bei Feststellen der Reaktion der Nährböden des Phenolphthaleins mittels Rücktitration, da Lackmuspapier als Indikator dem Phenolphthalein bei weitem nachsteht.

3. Man gehe bei der Herstellung von Nährböden zu quantitativen wie zu qualitativen bakteriologischen Untersuchungsarbeiten vom Phenolphthaleinneutralpunkt aus. Nur auf diese Weise wird sich ein sicheres Maß des Alkalizusatzes überhaupt, wie die Bestimmung des optimalen Alkaligehaltes für das Wachstum eines jeden Bakteriums ermöglichen.

4. Man bringe die Nährböden erst nach vollendeter Sterilisation und nach Abkühlung auf 40 Grad Celsius mittels steriler $^1/_{10}$ Normallösung auf die gewünschte Reaktion. Zu dem Zwecke sterilisiert man abgemessene Mengen Nährboden in Reagenzgläsern und fügt, wenn man neutrale Nährböden vor sich hat, die bei der Sterilisation ihre Reaktion nicht ändern, jedem Reagenzröhrchen eine bestimmte Menge steriler $^1/_{10}$ Normalsäure oder Alkalilösung zu. Bei von Natur sauren Nährböden bestimmt man an dem Inhalt eines oder zweier Gläser den Neutralitätspunkt, um dem Rest entweder sofort oder vor jedem Versuche den für den einzelnen gewünschten bzw. optimalen Alkaligehalt zu verleihen.

a) Eiweißfreie Nährlösungen.

Bei Nährlösungen, die die Quelle des N und C in anorganischer Form enthalten, wird nach Nägeli[279] das N am leichtesten assimiliert, wenn es als NH_2 vorhanden ist, weniger als NH, noch weniger als NO. Eiweißfreie Nährlösungen sind von Pasteur[411], Cohn[61], Nägeli, Uschinsky angegeben worden.

Die Pasteursche Nährflüssigkeit besteht aus 1 Teil weinsaurem Ammoniak, 10 Teilen Kandiszucker und der Asche von 1 Teil Hefe auf 100 Teilen Wasser.

Die Cohnsche Nährlösung enthält

phosphorsaures Kali	0,1
krist. schwefelsaure Magnesia	0,1
dreibasisch phosphorsauren Kalk	0,01
weinsaures Ammoniak	0,2
dest. Wasser	20,0

Die Uschinskysche Lösung besteht aus

Wasser	1000,0
Glyzerin	30,0—40,0
Chlornatrium	5,0— 7,0
Chlorcalcium	0,1
Magnesiumsulfat	0,2— 0,4
Dikaliumphosphat	2,0— 2,5
Ammonium lacticum	6,0— 7,0
Natrium asparaginicum	3,5

Einfacher ist die folgende von C. Fränkel [111 u. 112] (1894) angegebene Lösung:

Kochsalz	5,0
Kaliumbiphosphat	2,0
Ammonium lacticum	6,0
käufl. Asparagin	4,0
Wasser	1000
verdünnte Natronlauge bis zur deutlich alkalischen Reaktion.	

Eine ähnliche Lösung hat Maassen [255] bereitet:

Aepfelsäure	7,0
Asparagin	10,0
Magnesiumsulfat	0,4
sekundäres Natriumphosphat	2,0
kristallisierte reine Soda	2,5
trockenes Calciumchlorid	0,01
Wasser	1000,0
Kohlehydrat	$^1/_2$—1 Proz.

Sind die vorhergehenden Nährlösungen mehr universell und rein empirisch zusammengestellt, so haben Proskauer & Beck [326] eiweißfreie Nährlösungen, die für eine bestimmte Versuchszeit nur die für einzelne Bakterienarten nötigen Substanzen in der für sie notwendigen Konzentration enthielten, hergestellt.

Wachstum des Tuberkelbacillus haben Proskauer & Beck z. B. auf folgenden eiweißfreien Nährlösungen erzielt.

Käufliches Ammoniumkarbonat	0,35 Proz.
Monokaliumphosphat	0,13 „
Magnesiumsulfat	0,25 „
Glyzerin	1,5 „

Kuntze [226] empfiehlt anstatt des Dikaliumphosphats (K_2HPO_4) für Farbstoffbildner das saure Salz (KH_2PO_4). Calimard und Lacomme setzten Harnstoff oder Amine, Leucin, Tyrosin etc. zu einer Salzlösung, die 0,5 Proz. Kochsalz, 0,05 Proz. Magnesiumsulfat, 0,2 Proz. glycerophosphorsauren Kalk und 1,5 Proz. Glyzerin enthält und mit Kaliumkarbonat schwach alkalisiert wird.

Die künstlichen Nährlösungen werden in vorher im Trockenschrank sterilisierte Gefäße mit Watteverschluß eingefüllt und 3mal 20—25 Minuten im Dampf sterilisiert.

b) Die eiweißhaltigen Nährböden.

Man wendet die eiweißfreien Nährböden in der Regel nur zu besonderen biologischen Studien an und bedient sich im übrigen solcher Nährböden, in denen Eiweiß die Stickstoffquelle darstellt. Meist ist dabei der wesentliche Bestandteil des Nährbodens das Infus einer solchen eiweißhaltigen Substanz, auf der die Bakterien auch unter den gewöhnlichen Bedingungen sich finden. Saprophyten, die auf Gras vorkommen, wird man zweckmäßig in einem Heuinfus, solche die auf Mist sich finden, in Mistinfus züchten etc. Für die Nährböden pathogener Bakterien wird am häufigsten ein Fleischinfus verwandt, das Eiweiß- und Extraktivstoffe in annähernd der gleichen Beschaffenheit und etwa in gleichem Konzentrationsgrad enthält, wie das Blut, und überall leicht und billig herzustellen ist.

α) Herstellung der Nährbouillon.

Die Bereitung des unter dem Namen Nährbouillon bekannten Nährbodens gestaltet sich wie folgt:

Fettfreies, gehacktes oder geschabtes Fleisch wird in einem Kolben mit der doppelten Menge destillierten Wassers übergossen, durch kräftiges Umschütteln gut im Wasser verteilt und 12—24 Stunden an einen kühlen Ort — im Sommer in den Eisschrank — gestellt. (Man nimmt i. R. Rindfleisch oder das billigere Pferdefleisch, das für die meisten Zwecke brauchbare Nährböden liefert. Die Bouillon aus Pferdefleisch ist etwas trüber als die aus Rindfleisch, hat einen reicheren Gehalt an Glykogen resp. Zucker. Manchmal ist es zweckmäßig, bestimmte Fleischsorten zu bevorzugen. Ein sehr geeignetes Ausgangsmaterial sind, falls erhältlich, frische menschliche Placenten oder Föten. Auf damit bereiteten Nährböden sollen einige menschenpathogene Arten besonders gut gedeihen. Zur Züchtung der Bakterien des Meeres empfiehlt z. B. Fischer[105] nach der Untersuchung der Planktonexpedition Herstellung der Nährböden mit Seewasser und Verwendung von Fleisch frischer Seefische statt Rindfleisch.)

Während des Aufenthaltes im Eisschrank werden die löslichen Eiweiß- und Extraktivstoffe ausgelaugt. Man kann schneller zu diesem Ziel kommen, wenn man das mit Wasser übergossene Fleisch 1 Stunde über freier Flamme kocht oder nach Petri & Maassen[310] zuerst 1 Stunde bei Zimmertemperatur, dann 3 Stunden bei 60° hält und danach noch eine halbe Stunde kocht. Bei diesem Verfahren ist für einen Ersatz des verdampfenden Wassers Sorge zu tragen, da sonst die Bouillon zu dunkel wird; aber auch sonst neigt nach diesen Methoden bereitete Bouillon leicht zur Trübung.

Die die löslichen Bestandteile des Fleisches enthaltende Brühe, das „Fleischwasser", wird nun durch ein Tuch geseiht; dann wird das Fleisch nachgeschüttet, in das Seihtuch eingeschlagen und mit der Hand oder einer Fleischpresse noch kräftig ausgedrückt. Das Fleischwasser stellt eine rötlich gefärbte, schwach sauer reagierende Flüssigkeit dar. Da bei dem Modus der Bouillonbereitung ein großer Teil des Eiweißes durch Hitze ausgefällt wird, so wird noch ein nicht durch Kochen koagulabeler Eiweißkörper meist in der Form des Peptons hinzugefügt und ferner noch etwas NaCl. Man nimmt

i. R. 1 Proz. Pepton (am gebräuchlichsten Pepton. siccum Witte und $^1/_2$ Proz. NaCl zum Fleischwasser), für die Züchtung mancher Arten soll das französische Pepton Chapoteau sich besser eignen. Als Ersatzmittel des Peptons sind für bestimmte Zwecke andere Eiweißpräparate angegeben worden, so von Wassermann [431] die Nutrose (Kaseinnatriumphosphat), von Hesse [166–171] für Tuberkelbacillen der Nährstoff Heyden, von Laboschin [231] das Protogen usw. Die natursaure Reaktion der Bouillon wird durch kristallisierte reine Soda schwach alkalisch gemacht. Das Pepton löst sich relativ schnell, besonders bei leichter Erwärmung der Mischung. Sobald die Lösung vollzogen ist, wird die Flüssigkeit mit Hilfe einer gesättigten Natriumkarbonatlösung bis zum Lackmusneutralpunkt oder besser gegen Phenolphthalein neutralisiert und für 1—$1^1/_2$ Stunden einer Temperatur von 100° im Dampftopf oder Wasserbad ausgesetzt. Bei dieser Temperatur fällt das Eiweiß aus und schwimmt zusammengeballt in der klaren Flüssigkeit. Dieselbe wird durch vorher mit destilliertem Wasser angefeuchtete Faltenfilter filtriert, nochmals auf Reaktion und Durchsichtigkeit hin geprüft und in vorher sterilisierte Gefäße eingefüllt. Diese werden mit Watteverschluß versehen und 1 Stunde lang im Dampf sterilisiert.

Cache [52] hat gefunden, daß Zusatz von $MgHPO_4$ zur Bouillon einen sehr guten durchsichtigen Nährboden gibt.

β) Bereitung fester durchsichtiger Fleischwasser-Nährböden mittels gelatinierender Substanzen.

Die Bouillon, der Hauptrepräsentant der flüssigen Nährmedien, bildet mit gelatinierenden Substanzen versetzt auch die Grundlage der von R. Koch eingeführten, festen Nährböden. Als die zur Erzeugung fester Nährboden gebräuchlichen Zusätze der Bouillon kommen die Gelatine und der Agar in Betracht.

Die Gelatine, die in Tafeln in den Handel kommt, ist ein Eiweißpräparat und besitzt saure Reaktion von wechselndem Grad. 10-proz. Gelatine schmilzt bei etwa 23—25° und erstarrt wieder bei unter 22°. Durch längeres Kochen kann die Erstarrungsfähigkeit aufgehoben werden.

Gaehtgens [125–129], der in systematischer Weise den Einfluß hoher Temperaturen auf den Schmelzpunkt der Nährgelatine untersucht hat, kommt zu folgendem Resultat: Je höher die Temperatur ist und je länger sterilisiert wird, um so tiefer sinkt der Schmelzpunkt der Gelatine. Am schnellsten geht das Sinken in der ersten Viertelstunde der Sterilisation vor sich. Bei steigender Alkaleszenz sinkt der Schmelzpunkt entsprechend, dies Sinken kann bei steigender Temperatur einen beträchtlichen Umfang erreichen. In der Erwärmungszeit wird bereits ein geringer Teil der Gelatine peptonisiert. Mit wachsender Konzentration steigt der Schmelzpunkt, mit abnehmender sinkt er, jedoch ist der Unterschied nur gering und steht in keinem Verhältnis zu dem Gelatinegehalt; zwischen einer 5- und 10-proz. Lösung beträgt er im Durchschnitt 0,8° C., zwischen einer 10- und 20-proz. 1,3—1,5° C. Nicht bei 10- und 20-proz. Gelatinelösungen, wohl aber bei 5-proz. läßt sich besonders nach längerer Sterilisation

eine auffallende Herabsetzung der Erstarrungsgeschwindigkeit wahrnehmen.

Auch durch peptonisierende Fermente wird die Gelatine verflüssigt. Häufig haften ihr sehr widerstandsfähige Sporen an.

Der Agar, der von Frau Hesse zuerst empfohlen wurde, ist pflanzlichen Ursprungs. Es ist die Gallerte von Seetangen und kommt pulverisiert oder in Säulen gepreßt in den Handel. Agar ist ein Kohlehydrat von neutraler Reaktion. Er schmilzt bei etwa 90° und erstarrt wieder bei unter 40°. Beim Erstarren wird der Agar etwas trübe, preßt Wasser aus und zeigt unterm Mikroskop leicht fädige Beschaffenheit.

Entsprechend dem verschiedenen chemischen und physikalischen Verhalten der beiden Stoffe ist die Bereitung des Nähragars und der Nährgelatine eine etwas verschiedene.

Herstellung der Nährgelatine.

Dem Fleischwasser wird außer den bereits bei der Bereitung der Bouillon erwähnten Zusätzen (Kochsalz und Pepton) noch 10 Proz. Gelatine zugegeben. Zu deren Lösung wird der Kolben kurze Zeit leicht erwärmt. Stärkere Erhitzung ist zu vermeiden, da sonst Eiweiß vorzeitig ausfällt. Nachdem die Gelatine gelöst ist, wird die Flüssigkeit neutralisiert. Da die Gelatine an sich eine starke, je nach der Bereitung des Produkts schwankende saure Reaktion besitzt, so ist der Verbrauch an Alkali zur Neutralisation natürlich größer wie bei der gleichen Bouillonmenge. Nach der Neutralisation erfolgt Erhitzen im Dampftopf und Filtration wie bei der Bouillonbereitung. Die Filtration geht um so schneller von statten, je heißer die Lösung ist. Es empfiehlt sich daher, dieselbe nach den S. 391 angegebenen Methoden vorzunehmen. Durch das Kochen kann die vorher alkalische Reaktion der Gelatinelösung wieder umschlagen („Nachsäuern“ der Gelatine). Es ist daher nötig, vor oder nach der Filtration die Reaktion nochmals zu prüfen. Man hüte sich aber davor, in Rücksicht auf das Nachsäuern der Gelatine von vornherein einen höheren Alkaleszenzgrad zu geben, da dies die Klärung beim Kochen beeinträchtigt. Die durch das Filter ablaufende Gelatine muß absolut klar sein und klar bleiben, wenn eine Reagenzglasprobe aufgekocht und dann schnell in Eiswasser abgekühlt wird. Zeigt sich die Gelatine auch bei wiederholter Filterpassage noch etwas trübe, so wird zu der unter den Koagulationspunkt der Eiweißkörper abgekühlten Flüssigkeit das Weiße eines Hühnereis zugegeben. Dann kommt sie wieder für kurze Zeit in den Dampf, wo die Trübungen meist durch das ausfallende Eiweiß mit niedergerissen werden.

Die Gelatine wird zuweilen, namentlich wenn sie nach der Fertigstellung in neuen Glasgefäßen aufbewahrt wird, noch nachträglich trübe. Dies rührt von dem Alkaligehalt neuer Gläser her. Es empfiehlt sich daher, solche Gefäße vor der Benutzung mit angesäuertem Wasser auszuspülen (s. o.).

Die filtrierte Gelatine wird wie Bouillon in sterile Gefäße eingefüllt (Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläser). Dabei ist darauf zu achten, daß beim Einfüllen keine Gelatine an die Stellen gelangt, die der Wattepfropf berührt, da dieser sonst am Glas festklebt. Die Sterilisation der Gelatine in den mit Watte keimdicht verschlossenen

Gefäßen erfolgt nicht wie die der Bouillon durch einstündiges Erhitzen im Dampftopf bei 100°. Da eine so langdauernde Erhitzung die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine beeinträchtigen würde, so wird sie diskontinuierlich sterilisiert.

Bisserie[24] gibt eine rasche und einfache Methode zur Bereitung von Gelatine- und ähnlichen Nährböden an: Der im Wasserbad verflüssigte Gelatinenährboden wird in ein zylindrisches Gefäß gebracht; in dieses wird ein zweites konisches oder ballonförmiges Gefäß mit der Oeffnung nach unten eingeführt. Unter der Oeffnung dieses zweiten Gefäßes ist eine dreifache filtrierende Membran (feines Tuch aus Leinwand) ausgespannt. Das Ganze wird in den Autoklaven gebracht, erst auf 100 Grad erwärmt, später auf 120 Grad weiter erhitzt. Nach einigen Minuten läßt man den Autoklaven sich abkühlen und läßt dann die Luft ganz allmählich eindringen. Der atmosphärische Druck treibt nun die ganze verflüssigte heiße Gelatine durch die Membran in das ballonförmige Gefäß und man erhält so ein sehr klares steriles Filtrat.

Nach der Sterilisation wird die erstarrte Gelatine gebrauchsfertig an einem kühlen, dunklen Orte aufbewahrt.

Durch eine länger dauernde Erhitzung wird, wie erwähnt, der Verflüssigungspunkt der Gelatine herabgesetzt, während man eine Gelatine von höherem Schmelzpunkt dadurch erhält, daß man den Sterilisierungsprozeß nach Möglichkeit abkürzt und die Gelatinemenge vermehrt. Derartige Gelatinenährböden vom Schmelzpunkt von etwa 30° sind u. a. von Pane, Elsner[89] angegeben. Forster[107] erhielt Gelatine von hohem Schmelzpunkt durch folgendes Verfahren. Er löste die Gelatine in Löfflerscher Bouillon, die in einem Teekessel auf 60° erhitzt war, alkalisierte und gab Eiweiß zu. Die Sterilisierung erfolgt nach Einstellung des Kessels in siedendes Wasser, in dem dieser 15 Minuten lang stehen bleibt. Nunmehr wird bei 60° durch ein Filter filtriert. Das Filtrat kommt in sterile Reagenzgläser und wird 20 Minuten in siedendem Wasser erhitzt. Die auf diese Weise bereitete Gelatine ist steril, wenn nicht zufällig das Rohprodukt widerstandsfähige Sporen enthielt. Der Schmelzpunkt liegt nach 24-stündigem Erstarren bei 29—30°. van't Hoff[178] erreichte eine Erhöhung des Schmelzpunktes der Gelatine durch Zusatz von Formalin. Trotzdem für eine ausreichende Erhöhung nur minimale Mengen von Formalin nötig sind, dürfte dieses Verfahren doch wegen der wachstumshemmenden Eigenschaft des Formalins nicht praktisch verwertbar sein.

Herstellung des Nähragars.

Aehnlich wie die Herstellung der Gelatine gestaltet sich die Bereitung des Nähragars.

Um die an und für sich sehr mühsame Agarfiltration nicht noch durch die Gegenwart des ausgefällten Eiweiß zu erschweren, wird das Fleischwasser mit Kochsalz und Peptonzusatz zunächst ohne Agarzusatz 1 Stunde im Dampf gekocht, bis das Eiweiß koaguliert ist. Dann wird durch Filtrierpapier filtriert und das Filtrat mit 1—2 Proz. Agar versetzt. Zur Lösung des Agars wird die Flüssigkeit im Dampftopf oder über freiem Feuer leicht erwärmt. Danach wird neutralisiert und im Dampftopf ca. 1 Stunde lang bei 100° gekocht. Filtration,

Kontrollierung der Reaktion und Prüfung der Durchsichtigkeit erfolgt wie bei der Gelatine (eventuell Klärung mittels Hühnereiweiß).

Rosam[335] empfiehlt, den Agar nach der Zerkleinerung auf etwa 5 Minuten in 10-proz. Essigsäure zu legen. Hinterher wird die Essigsäure mit fließendem Wasser ausgewaschen und der so präparierte Agar kann getrocknet und längere Zeit aufbewahrt werden. Durch diese Behandlung soll er leichter filtrieren, einen niedrigeren Schmelzpunkt bekommen und erst bei 35 Grad fest werden.

Jokott[184] stellte Agar schnell auf einfache Weise wie folgt her. 500 g fettfreies, gehacktes Fleisch werden mit einem Liter Wasser vermischt, auf dem Sandbad stark erhitzt, nach $1^1/_2$ Stunden filtriert; zu einem Liter Filtrat werden 15 g Agar hinzugefügt, 1 Stunde auf dem Sandbad gekocht; Zusatz von 10 g Pepton, 5 g Kochsalz und Neutralisation mit Sodalösung bis zur schwachen Alkaleszenz, Abkühlen bis 50°, Zusatz von 2 Hühnereiweiß, Erhitzen 1—2 Stunden im Sandbad auf 100° unter Ersatz des verdunstenden Wassers. Filtration durch feuchte Faltenfilter.

Marpmann[259 u. 260] erhält nichtschwitzenden Agar auf folgende Weise: Man kocht Agarpulver (20 g) mit 1,5 Liter Fleischbrühe (hierzu 30 g NaCl und 50 g Glyzerin); nach der Lösung des Agars setzt man 10 g Traganthpulver in 100 g 80-proz. Alkohol gelöst zu, schüttelt die Mischung, kocht auf freiem Feuer einmal auf und verfährt im übrigen wie gewöhnlich.

Die geschilderten drei Nährmedien genügen zur Züchtung bei weitem der meisten Bakterienarten, sowohl was die Zusammensetzung als den Reaktionsgrad anlangt. Einzelne Bakterienarten bevorzugen jedoch eine andere Reaktion, sei es eine stärker alkalische (Cholera), oder schwach saure (Tuberkelbacillus), um zu einem ergiebigen Wachstum zu gelangen. Darauf ist bei der Einstellung der Reaktion Rücksicht zu nehmen.

Für den Cholerabacillus hat z. B. Hesse[166—171] das Optimum des Alkaleszenzgrades ermittelt. Es ist das 0,4—0,9 g kristallisierten Natriumkarbonats auf 1 l Nähragar.

Wenn aber selbst ein großer Alkaliüberschuß von den meisten Bakterien gut vertragen wird, finden auf sauer reagierenden Nährböden selbst bei schwachem Säuregrad nur die wenigsten Arten ein Fortkommen. Eine Ausnahme machen z. B. die Essigbakterien, welche erst beim Gehalt von 2 Proz. Säure wachsen.

Als Ersatz des Fleischwassers kann man eine Fleischextraktlösung benutzen, die im Mengenverhältnis von $^1/_2$—1 Proz. der Peptonkochsalzlösung zugefügt wird. Die Verarbeitung der Fleischextraktlösung zu Nährböden erfolgt genau wie die des Fleischwassers. Die Bereitung der Nährböden gestaltet sich wohl etwas einfacher; aber an Güte sind die Fleischwassernährböden überlegen. Das Fleischextrakt enthält zuweilen sehr widerstandsfähige Sporen, hat einen schwankenden Salzgehalt und verleiht dem Nährboden eine dunkle Farbe.

Man kann auch auf das aus dem Fleisch stammende Eiweiß ganz verzichten und die Peptonkochsalzlösung direkt als Nährboden verwenden. Herstellung: 10,0 g Kochsalz, 10,0 Pepton sicc. Witte auf 1 l Leitungswasser; leicht erwärmen zur Lösung des Peptons; 1 Stunde im Dampftopf kochen; filtrieren; in sterilen Gefäßen fraktioniert im Dampf sterilisieren.

Stolp[393] hat Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Sterilisatorfleischbrühe von Schlachthöfen angestellt und kommt zu dem Schluß, daß sie sich recht gut für die Verarbeitung zu Nährböden eignet.

Hart[153] hat Maggis gekörnte Fleischbrühe anstatt Fleischwasser empfohlen: 10 g gekörnte Fleischbrühe und 10 g Pepton werden mit 1 l Wasser übergossen und bis zur Lösung kochen gelassen. Nach dem Kochen Prüfen der Reaktion, Filtrieren der Lösung und weiteres Verarbeiten zu Nährböden in der üblichen Weise.

Nach den Angaben von Marx[262] wird von der Firma Merck-Darmstadt in Pulverform ein Präparat in den Handel gebracht, welches neben der eben erwähnten Maggibouillon Agar, Pepton und Salz in solchen Mengen enthält, das 42 g des Pulvers genügen, mit einem Liter Wasser einen Nähragar von der gewöhnlichen Zusammensetzung (Fleischwasser mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Agar) zu erhalten. Die Vorteile dieses Präparates sind bequeme Handhabung und Dosierung und sehr leichte Löslichkeit, die wohl eine Folge der sehr feinen Pulverisierung ist. Infolgedessen genügt es, das Pulver 1 Stunde im Dampftopf zu kochen, um einen Nährboden zu erhalten, der durch ein Faltenfilter in ungewöhnlich kurzer Zeit filtriert. Die Filtration kann natürlich durch Einstellen in den Dampftopf noch beschleunigt werden. — Neben diesem Pulver, das unter dem Namen „Ragitagar" käuflich ist, wird auch für Herstellung von Bouillon noch ein Pulver angefertigt, von dem 22 g, in einem Liter Wasser gelöst, die übliche Nährbouillon ergeben. Die so gewonnenen Nährböden sind schwach alkalisch, nach Belieben können sie auch stärker alkalinisiert werden. Sie sind in bezug auf Nährstoff und Alkaleszenz so eingestellt, daß sie auch für empfindliche Bakterien, wie Streptokokken, Pneumokokken etc. ein ausgezeichnetes Nährmedium darstellen. Der 2-proz. Ragitagar ist so fest, daß er auch zur Herstellung von Ascitesagar und ähnlichen Nährböden zu verwenden ist.

Die Nachprüfung der Verwendbarkeit der Marxschen Ragitagarnährböden durch verschiedene Autoren, von denen nur Sparmberg und Amako[586] genannt seien, hat gute Resultate ergeben.

Doerr[80a] trocknet nach ähnlichen Prinzipien fertige Nährböden (Agar, Drigalskiagar [s. unten] usw.) und pulverisiert sie. Zum Gebrauch ist nur Zusatz entsprechender Mengen von Wasser und Sterilisation notwendig; beide Verfahren eignen sich speziell für fliegende Laboratorien, für Kriegslaboratorien usw.

Direkte Ersatzmittel für das Fleischwasser stellen menschliche resp. tierische Exsudate, Se- und Exkrete wie Harn, Ascites-Hydrocelenflüssigkeit, Milch usw. dar.

Milch kann direkt wie Bouillon als flüssiger Nährboden verwendet werden. Da die bei Verwendung von Vollmilch auf der Oberfläche schwimmende Fetthaut eventuell stören kann, so benutzt man Magermilch. Dieselbe wird entweder an 5—6 aufeinander folgenden Tagen je einige Minuten im Dampftopf oder durch einmaliges Erhitzen im Autoklaven bei 120° sterilisiert. Bei der Sterilisation im Autoklaven bräunt sich die Milch leicht infolge Karamelisierung des Milchzuckers. Die Milch läßt sich auch chemisch durch Chloroform sterilisieren (Sterling[390 u. 391]). Man versetzt zu dem Zweck mit Chloroform im Ueberschuß und vertreibt das Chloroform nach 14 Tagen durch höhere Temperaturen. Mit der gleichen Menge

Agar resp. Gelatine versetzt, läßt sich die Milch auch zu festen, allerdings undurchsichtigen Nährböden verarbeiten. Raskin[327] ist die Herstellung durchsichtiger, fester Milchnährböden gelungen. Diese haben sich nicht eingebürgert, denn die Bereitung ist relativ umständlich, und sie bieten gegenüber den Fleischwassernährböden keine wesentlichen Vorteile.

Harn läßt sich als flüssiges Nährmedium, wie zur Bereitung fester, durchsichtiger Nährböden benutzen. Am besten eignet sich der phosphatarme, in nüchternem Zustand gelassene Harn. Der nach Desinfektion des Orificium urethrae entleerte Urin ist, abgesehen von der ersten Portion, die man nicht auffängt, meist steril (Prüfung durch eintägigen Aufenthalt im Brutschrank). Eventuell kann er mittels Filtration durch Kerzen oder durch einmalige $^1/_4$—$^1/_2$-stündige Sterilisation im Dampf keimfrei gemacht werden. Bei letzterem Verfahren tritt jedoch infolge der Erhitzung bereits eine Zersetzung des Harnstoffs und eine Trübung durch Phosphatausscheidung ein. Die Farbstoffe des Harns, die in geringem Grad wachstumhemmend wirken, lassen sich durch Tierkohle entfernen. Zur Bereitung fester Harnnährböden wird der Harn wie Fleischwasser verwandt (Heller[163]). Piorkowski[316] hat speziell zur Züchtung von Typhusbacillen eine Harngelatine angegeben (s. bei Typhus).

Infus resp. Dekokt von Pflanzenfresserkot, besonders von Pferdemist wird zur Züchtung von Schimmelpilzen benutzt. Bereitung: Auf 3 Ballen Pferdekot $^1/_2$ l Wasser, $1^1/_2$ Stunden kochen, durch Tuch filtrieren (nicht durch Papier, das sich verstopft), mit Agar resp. Gelatine versetzen, kochen, filtrieren, in sterilen Gefäßen abgefüllt sterilisieren.

Infus bzw. Dekokt von Fischsubstanzen (Eingeweide, Köpfe, Schwänze von Kabeljau und grünen Heringen) wird zur Züchtung von Leuchtbakterien verwendet (Zettnow).

Als Nährlösungen pflanzlichen Ursprungs finden Infuse der verschiedensten Cerealien und anderer Früchte Verwendung. Dieselben werden in analoger Weise wie Fleischwasser hergestellt und können auch zur Bereitung fester Nährböden benutzt werden. Bierwürze (mit Agar) dient als Ersatz des Fleischwassers bei der Züchtung von Hefen.

γ) Zusätze zu den Nährböden.

Für gewisse Zwecke versetzt man sowohl Bouillon wie Gelatine und Agar noch mit gewissen Zusätzen.

Zunächst sollen sie zur Erhöhung der Nährfähigkeit für einzelne anspruchsvolle Arten dienen. Eine Methode, um die Nahrungsbedürfnisse einer Bakterienart kennen zu lernen und die quantitativ und qualitativ optimale Zusammensetzung ihres Nährsubstrats zu ermitteln, rührt von Beijerinck[13–16] her. Er goß Platten des gewöhnlich zusammengesetzten festen Nährmediums (Gelatine oder Agar) und ließ an verschiedenen Stellen gelöste Nährsubstanzen in verschiedener Konzentration in den festen Nährboden hineindiffundieren. Er impfte dann die auf ihre Wachstumsverhältnisse zu untersuchende Bakterienart auf diese Platten. An der Stelle, wo die Bakterien am besten gediehen, hatte der Boden die für das Wachstum günstigste Zusammensetzung. Er erhielt auf diese Weise gewissermaßen eine

bildliche Darstellung der Wachstumsenergie unter gewissen Ernährungsbedingungen und bezeichnete solche Platten als „Auxanogramme", die Methode als Auxanographie.

Zusätze, mit denen man Bouillon, wie Gelatine und Agar versieht, sind ferner solche, die dazu dienen, durch chemische Umsetzungen gewisse biologische Eigenschaften der Bakterien zu demonstrieren und damit zur Differenzierung sich morphologisch und färberisch gleich verhaltender Arten beizutragen.

Endlich stellt man durch gewisse Zusätze Nährböden her, die das Wachstum einzelner in Bakteriengemischen vorhandenen Arten begünstigen oder hemmen und dadurch die Isolierung erleichtern (elektive resp. spezifische Nährböden). Die Zusätze werden meist erst hinzugefügt, wenn das Nährmedium zum Abfüllen in Gläser fertig ist. Dies geschieht aus dem Grund, um eine Zersetzung der betreffenden Substanzen bei der mit der Bereitung des Nährmediums verbundenen, langdauernden Einwirkung höherer Temperaturen zu vermeiden.

Die wichtigsten Zusätze seien im folgenden mit den zugehörigen Rezepten kurz aufgeführt.

Traubenzuckerhaltiger oder milchzuckerhaltiger Nährboden wird in der Weise hergestellt, daß den fertigen Nährmedien vor der Sterilisierung 0,3—0,5 Proz. Traubenzucker zugesetzt wird. Ein Mehr ist schädlich, da es bei zu hohem Zuckergehalt leicht infolge der Tätigkeit der Bakterien zu stärkerer Säurebildung im Nährboden kommt, wodurch das Wachstum der Keime gehemmt wird (Smith [383]). Es sei hier erwähnt, daß die mit Fleischinfus bereiteten Nährböden infolge des Gehalts an Muskelzucker (Glukose) in der Regel geringe Mengen von Zucker schon an sich enthalten (Péré [305]). Absolut zuckerfreie Gelatine und Bouillon erhält man bei Verwendung von Fleisch, dessen Glukose durch ca. zweitägige Aufbewahrung bei 10—15° zersetzt ist (Milchsäurebildung; Péré, Spronck). Nach Shmith ist ferner das Fleisch schlecht genährter (tuberkulöser) Rinder an sich zuckerfrei.

Die Herstellung zuckerfreien Nähragars gelingt nicht, da beim Kochen des Agar-Agars, das bekanntlich ein Kohlehydrat ist, stets geringe Mengen Zucker abgespalten werden (Beijerinck).

Der Zuckerzusatz dient erstlich zur Verbesserung des Nährmediums, dann zum Nachweis der Fähigkeit gewisser Arten CO_2 zu bilden. Durch die reduzierende Eigenschaft des Zuckers ist auch in zuckerhaltigen Nährmedien die Anaërobenzüchtung erleichtert. Zur Anaërobenzüchtung werden auch andere reduzierende Substanzen, vor allem ameisensaures Natron oder indigschwefelsaures Natron besonders zu Agar zugesetzt (gleichfalls etwa 0,5 Proz.) (näheres s. bei Anaërobenzüchtung).

Ein wesentlich besseres Wachstum verschiedener Bakterien, vor allem aber der auf den einfachen Nährböden nur äußerst kümmerlich gedeihenden Tuberkelbacillen wird durch Zusatz von ca. 5 Proz. Glyzerin erreicht.

Herstellung von Nährböden mit Zusatz von Blut.

Die Züchtung auf Blut entspricht für pathogene Bakterien am ehesten den Bedingungen ihres natürlichen Vorkommens. Dem-

entsprechend haben sich Blutbouillon (Delius & Kolle [75]) und Blutagar (Pfeiffer [313]) als vorzügliche Nährmedien für gewisse pathogene Keime erwiesen, die, wie z. B. der Influenzabacillus, auf anderen künstlichen Böden überhaupt nicht gedeihen.

Das unter aseptischen Kautelen (nach gründlicher Beseitigung der zur Desinfektion verwandten Antiseptica von der betreffenden Hautstelle) entnommene Blut wird in geringen Mengen der Nährbouillon zugesetzt oder mit der Platinöse auf der Agaroberfläche verrieben. Die so vorbereiteten bluthaltigen Nährböden kommen eventuell für 24 Stunden zur Kontrolle in den Brutschrank; danach werden bakteriell verunreinigte ausgeschieden, die übrigen zur Impfung benutzt.

Schottelius [364] gibt für die Anfertigung von Menschenblutagar die folgende Anleitung:

Man verflüssigt ein Röhrchen mit 3—6 ccm gewöhnlichen Agars und hält es bei 45—50° flüssig. Dann wird eine dünne Glaskapillare, wie sie für die Opsoninuntersuchung nach Wright benutzt wird, über ganz kleiner leuchtender Flamme zur Schmelzglut erhitzt, aus der Flamme entfernt und rasch ausgezogen; die Anfangsteile des so entstandenen Kapillarfadens bilden dann 2 außerordentlich feine sterile Nadeln. Nachdem man nun die Nagelgliedseite des linken Mittel- oder Zeigefingers mit etwas Alkohol gereinigt hat, bringt man auf die Haut zwischen Nagelwurzel und Phalangealgelenk ein Tröpfchen Kollodium, das rasch zu einem Häutchen erstarrt. Hierauf führt man mit dem Arme einige Schleuderbewegungen nach unten aus, um das Blut in Hand und Fingern zu stauen, und umwickelt dann den betreffenden Finger von der Basis her rasch mit einem gewöhnlichen Leinenband bis herauf zum Nagelglied, dieses nimmt sofort die dunkelrote Farbe der Stauungshyperämie an. Nun sticht man mit einer der feinen Glasnadeln ein- oder zweimal durch das Kollodiumhäutchen in den Finger; die Stiche verursachen wegen der Feinheit des Instrumentes kaum eine Schmerzempfindung. Trotzdem quillt das Blut infolge der Stauung sofort in großen Tropfen hervor. Man lüftet nun rasch den Wattepfropf des bei 45° flüssig gehaltenen Agarröhrchens und läßt das Blut in das flüssige Nährmedium *eintropfen*. Durch leichteres oder stärkeres Krümmen des umwickelten Fingers kann man die Tropfgeschwindigkeit unschwer erhöhen und so in etwa 10 Sekunden die nötigen 6—8 Tropfen Blut gewinnen. Durch Schütteln wird es dann in dem flüssigen Agar gleichmäßig verteilt. Endlich bringt man nun von diesem flüssigen Blutagar auf die Oberfläche eines gewöhnlichen Schrägagarröhrchens $^3/_4$—$1\,^1/_2$ ccm und läßt den Nährboden in wagrechter Lagerung, am besten in einer mit Sand gefüllten flachen Schale als gleichmäßige Schicht erstarren. Mit den 5 ccm flüssigen Blutagars kann man so unschwer 4—6 Blutröhrchen gewinnen. Die bluthaltige Agarschicht überzieht dann als gleichmäßige 3—5 mm starke dunkelrote Decke den Nährboden.

Besonders geeignet ist neben Menschenblut das von Tauben (Entnahme am besten aus der Flügelvene) oder Rinderblut (Dieudonné-scher Blutalkaliagar zur Choleradiagnose).

Bernstein & Epstein [19] präparierten Ochsenblut mit Formalin für Blutnährböden auf folgende Weise: 400 ccm Ochsenblut werden in eine sterile Flasche gegeben, die 30 ccm einer 1-proz. Lösung von Ammoniumoxalat in destilliertem Wasser und 0,5 ccm 40-proz. For-

malinlösung enthält. Nachdem man die Flasche 1—2 Minuten geschüttelt hat, läßt man die Mischung $^1/_2$ Stunde stehen, füllt dann das sterilisierte Blut in kleine Kolben und verdünnt mit 0,5-proz. Salzlösung auf das doppelte Volumen. Der Formalingehalt des Blutes ist jetzt 1:2400. Fügt man jetzt 1 Teil Blut zu 15 Teilen Bouillon, Agar usw., so beträgt die Formalinkonzentration im Nährboden 1:36000 und soll für die meisten Organismen unschädlich sein. Derartig präpariertes Blut bleibt, wenn es auf Eis gehalten wird, für längere Zeit brauchbar.

Cutolo[70] stellt einen Blutnährboden folgendermaßen dar:

Ochsenblut	500 g
Aqua destillata	1000 „
trockenes Pepsin	15 „
Salzsäure	15 „

Dieses Gemisch hält man 12 Stunden lang in einem Thermostaten bei einer Temperatur von 40—42° eingeschlossen, kocht es dann eine halbe Stunde lang und filtriert es. Nach Neutralisation mit Soda bis zu leicht alkalischer Reaktion kann man das Gemisch zur Herstellung von Gelatine oder Agar verwenden.

Das wirksame Prinzip des Blutes ist nach R. Pfeiffer das Hämoglobin. Dieses kann man ebenso wie Hämatogen an Stelle des Blutes verwenden.

Gewinnung des Hämoglobins: Frisches Blut wird in ein steriles Gefäß mit steriler physiologischer Kochsalzlösung eingerührt und 24 Stunden im Eisschrank sedimentiert. Der Bodensatz der roten Blutkörperchen wird noch zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen. Das Hämoglobin wird durch Schütteln der Erythrocyten mit Aether oder durch Gefrierenlassen und Wiederauftauen derselben frei gemacht; Verdunsten des Aethers. Die so dargestellte reine Hämoglobinlösung wird zum Schluß durch Kerzen filtriert.

Von dem käuflichen Hämoglobin nach Heim[158] werden 10 g mit 90 ccm Aqua dest. und 10 ccm 10-proz. Kalilauge versetzt und im Dampf sterilisiert. Zu 1 ccm dieser Mischung gibt man ca. 7 ccm Nährsubstrat.

Cantani[55] bestrich Agar statt mit Blut mit Sperma, das etwa in gleicher Weise auf das Wachstum wirkt.

Herstellung von Nährböden aus Blutserum.

Das Blutserum ist ein Nährboden, der vor allen Dingen pathogenen Bakterien vermöge der für sie günstigen, natürlichen Zusammensetzung ein ausgezeichnetes Nährsubstrat liefert und auch die Züchtung von Arten ermöglicht, die sich anderen Nährböden unvollkommen oder gar nicht anzupassen vermögen. Das Blutserum kann einmal als flüssiger Nährboden verwendet werden, dann aber benutzt man es zur Bereitung von festen Nährböden auf Grund seiner Fähigkeit, vermöge seines Eiweißgehalts bei etwa 65° zu einer festen durchsichtigen Gallerte zu erstarren. Ein Nachteil gegenüber anderen festen, durchsichtigen Nährböden beruht darauf, daß das einmal erstarrte Serum sich nicht wieder auflöst. Die Erstarrungsfähigkeit ist bei den Seris verschiedener Provenienz nicht gleich. Sehr ausgesprochen ist sie bei Rinder- und Hammelserum, das auch zu Nährböden ausgedehnte Verwendung findet.

Erhitzt man das Serum stärker, so wird es zwar undurchsichtig, aber in seiner Qualität als Nährsubstrat erleidet es keine Veränderung. Man kann es, wenn man auf die Durchsichtigkeit verzichten will, alsdann auch bequem im strömenden Dampf sterilisieren. Da sehr viele Bakterienarten auf Serum ein sehr charakteristisches Oberflächenwachstum zeigen, so fällt die Undurchsichtigkeit des auf diese Weise sterilisierten Serums weniger ins Gewicht.

Das Auffangen des Blutes zur Bereitung der Serumnährböden geschieht, wenn es möglich ist, unter aseptischen Kautelen in sterilen Gefäßen. Das Blut kommt zur Ausscheidung des Serums an einen kühlen Ort und wird, sobald die Gerinnung vollständig erfolgt ist, mit einem sterilen Glasstab von den Wänden des Gefäßes gelöst. Diese Prozedur erleichtert die Ausscheidung. Die Ausbeute beträgt etwa 100—200 ccm auf 1 l Blut. Das Serum wird mit sterilen Pipetten abgenommen und in sterilen Gefäßen flüssig aufbewahrt oder zu festen Serumböden verarbeitet. Zu dem Zweck bringt man es in Petrischalen oder in schräggestellten Reagenzgläsern in einen mit Wasser gefüllten doppelwandigen Blechkasten, in dem es bei einer Temperatur von 65° zum Erstarren gebracht wird (Fig. 55). Zur Prüfung der Sterilität kann man die Nährböden für 24 Stunden in den Brutschrank bei 37° bringen (R. Koch).

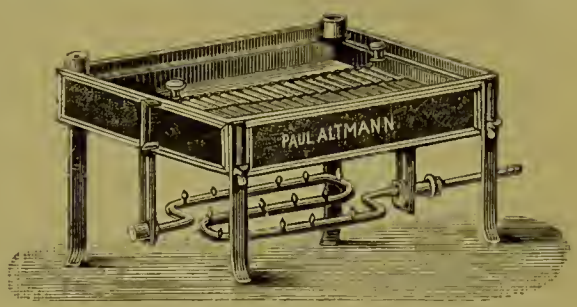


Fig. 55.

Die sterile Entnahme menschlichen Blutes geschieht durch Aderlaß oder man benutzt nach Bumms[48] Vorschlag das nach der Geburt aus dem mütterlichen Ende der Nabelschnur zu gewinnende Blut.

Die Bereitung von Serumnährböden gestaltet sich abweichend von der soeben geschilderten Methode, wenn es nicht möglich ist, das Serum steril zu erhalten. In diesen Fällen muß es nämlich vor oder nach dem Erstarren sterilisiert werden. Die Durchsichtigkeit kann gewahrt bleiben, wenn man das Serum durch keimdichte Filter filtriert oder nach Kochs (l. c.) Vorschlag 8 Tage lang fraktioniert bei 60° sterilisiert. Kirchner[204] empfiehlt, das Serum 2 Monate lang in gut verkorkten Flaschen unter Zusatz von 1—2 Proz. Chloroform in der Dunkelheit an einem kühlen Ort aufzubewahren. Die Erstarrung bei einer Temperatur von über 65° genügt alsdann, um das flüchtige Chloroform auszutreiben.

Nach den Angaben von Elschnig[87 u. 88] wird von der Firma Altmann-Berlin ein für die Herstellung von Nährböden bestimmtes getrocknetes Pferdeserum in den Handel gebracht, das, in bestimmtem Verhältnis zu Nährbouillon zugesetzt, namentlich für Streptokokken ein gutes Nährmedium liefert.

Zur Züchtung der Spirochaeta pallida wird autolysiertes Pferdeserum empfohlen (Schereschewsky[357—360], Mühlens[274], Noguchi[287] u. a.).

C. Fränkel[111 u. 112] verzichtet auf die Durchsichtigkeit und sterilisiert nach dem Erstarren bei höherer Temperatur auf die gewöhnliche Weise im strömenden Dampf.

Ein besonders für die Züchtung der Diphtheriebacillen vorteilhafter Zusatz zum Serum, das am besten vom Hammel stammt, besteht nach Löffler[246] in Traubenzuckerbouillon. Zu 3—4 Teilen Blutserum wird 1 Teil leicht alkalischer Bouillon gesetzt, die mit 1 Proz. Pepton, $^1/_2$ Proz. Kochsalz und 1 Proz. Traubenzucker hergestellt ist. Die Erstarrung muß bei 90—95° vorgenommen werden.

Zur Herstellung von Blutgelatine vermischte Koch das Serum mit gleichen Teilen Gelatine und sterilisierte fraktioniert bei 52°.

Hueppe[181] vermischte Blutserum mit 2-proz. wässeriger Agarlösung zu gleichen Teilen (oder 3 Teile Serum auf 2 Teile Agar) und erzielte so einen Serumnährboden, der in der üblichen Weise sterilisierbar ist und auch wieder verflüssigt werden kann.

Andere empfehlen, flüssiges steriles Blutserum auf 40—50° zu erwärmen und mit flüssigem, auf 40—50° abgekühltem Nähragar (3 Proz.) āā oder 1 : 2 zu vermischen.

Der Serumagar nach Tochtermann besteht aus einer Mischung von 2 Proz. wässeriger Agarlösung, 1 Proz. Pepton, 0,5 Proz. NaCl, 0,3—0,5 Proz. Traubenzucker, die mit Hammelblutserum āā oder 2 : 3 gemischt wird. Nach $1^1/_4$—$1^1/_2$-stündigem Kochen wird filtriert, in Reagenzgläser gefüllt und sterilisiert. Der Nährboden ist besonders für Diphtheriebacillen neben dem Löffler-Serum bestimmt.

Herstellung von Nährböden mit tierischen Exsudaten.

Eine ähnliche Zusammensetzung wie Blutserum haben Nährböden, die mit Hilfe seröser Exsudate (Ascites, Hydrocelen-Ovarialflüssigkeit) hergestellt sind. Die Verdünnung geschieht in gleicher Weise wie bei der Verwendung von Blutserum.

Zur Erzeugung homogener Kulturen von Tuberkelbacillen wurde von Gracowski & Nestor[140] empfohlen, diese Exsudate im Verhältnis von 20—50 Proz., je nach dem Eiweißgehalt mit Aqua dest. zu vermengen und 6 Proz. Glyzerin hinzuzufügen. Durch Kochen wird die Flüssigkeit leicht opalisierend, gerinnt aber nicht.

Cantani[55 u. 56] versetzt die albuminhaltige Flüssigkeit zu gleichen Teilen mit Glyzerin, nach mehreren Wochen wird die Mischung steril und ist dann gebrauchsfertig. Außer Ascites lassen sich in dieser Weise Urin, Eiter, Sperma, Milch, Blut etc. verwenden. Von den Mischungen, die er als Glyzerolate bezeichnet, kommen 0,5—0,75 Proz. auf ein mit Nährmedium in der gewöhnlichen Weise beschicktes Reagenzglas. Agar und Gelatine muß vorher natürlich verflüssigt werden.

Als besten Nährboden für die verschiedensten Mikroorganismen (auch Gonokokken und Meningokokken, Tuberkelbacillen) empfiehlt Cantani die folgende Zusammenstellung:

6 Teile Ascites (frisch oder aufbewahrt mit gleichen Teilen Glyzerin),
1 Teil Blutglyzerolat.

Von dieser Mischung 0,5—0,75 Proz. als Zusatz zu einem Agar- oder Bouillonröhrchen.

Poppe[321], der die Cantanischen Angaben bestätigt, stellte die Forderung auf, daß der Zusatz der Glyzerolatmischung zum Nährboden erst kurz vor der Verwendung erfolgen soll.

Auch indem man das Eiweiß der Körperflüssigkeiten in ein beim Kochen nicht fällbares Alkalialbuminat überführt, kann man mit

ihnen durchsichtige Nährböden auf folgende Weise nach KANTHAK & STEPHENS[189] herstellen.

Zu je 100 ccm des serösen Exsudats, das nicht zu eiweißreich sein darf, kommen 2 ccm 10-proz. Kalilauge, 1,5 Proz. Agar. Dazu 1,5—2 Proz. Glyzerin, Abfüllen in sterile Gläser, sterilisieren.

Hier sei auch der Nutrosenährboden von A. WASSERMANN[421 u. 422] erwähnt.

15 ccm hämoglobinfreies Schweineserum wird mit 30—50 ccm Wasser, 2—3 ccm Glyzerin, 0,8 g Nutrose gemischt und unter beständigem Schütteln 15 Minuten gekocht. Am folgenden Tage Wiederholen des Kochens. Zum Gebrauch wird die Flüssigkeit auf 50—60° erwärmt und mit 2-proz. Peptonagar von gleicher Temperatur āā gemischt. Der Nährboden ist besonders für die Fortzüchtung der Gonokokken bestimmt.

Bereitung fester Nährböden ohne Zusatz gelatinierender Substanzen.

Den meisten im voraufgehenden Teil behandelten festen Nährböden war gemeinsam die Zusammensetzung aus zwei Hauptbestandteilen, der eigentlichen Nährlösung und der die feste Konsistenz verleihenden Substanz (Gelatine oder Agar). Es gibt jedoch noch eine Reihe Nährsubstrate, die an sich eine feste Beschaffenheit haben oder durch einfache physikalische Prozesse (Erhitzen) in den festen Aggregatzustand übergeführt werden können.

Herstellung von Nährböden aus Kartoffeln.

Die Kartoffel stellt die älteste Form fester Nährböden dar (zuerst von SCHRÖTER benutzt), und kommt in gekochtem Zustand i. R. in der Form halbierter Kartoffeln, der Kartoffelscheibchen und der schräg halbierten Kartoffelzylinder zur Verwendung.

Die halbierte Kartoffel (KOCH[215]).

Gute, nicht zu kleine Kartoffeln (am geeignetsten sind Salatkartoffeln) werden mit einer Bürste unter dem Wasserleitungsstrahl gründlich gereinigt. Der in den Vertiefungen, aus denen die Keime heraustreiben („Augen"), sitzende Schmutz wird noch besonders mit Hilfe eines spitzen Messers ausgekratzt. Im übrigen ist die Schale der Kartoffel möglichst zu schonen, damit bei dem nunmehr folgenden Einlegen der Knollen in Sublimatlösung diese nicht zu leicht in das Innere der Kartoffel eindringen kann. Nach $^1/_2$—1 Stunde kommen die Kartoffeln aus der Sublimatlösung und werden $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde im Dampftopf gekocht. Nach genügender Abkühlung werden sie zwischen Daumen und Zeigefinger der linken, zuvor desinfizierten Hand an ihrem kleinsten Umfang gefaßt und mit einem sterilen Messer an dem größten Umfang durchschnitten. Die beiden noch zusammenliegenden Hälften läßt man auf dem Boden einer „feuchten Kammer" auseinander klappen, wobei sie so zu liegen kommen, daß die Schnittflächen nach oben schauen.

In der feuchten Kammer sollen die Kartoffeln vor Austrocknung und Verunreinigung geschützt werden; diese Kammern werden auf folgende Weise hergestellt. Der Boden beider Hälften einer großen Doppelschale von etwa 20 cm Durchmesser und 6—8 cm Höhe wird mit kreisrunden Filtrierpapierblättern bedeckt. Auf diese wird Sub-

limat geträufelt, bis das Fließpapier leicht damit getränkt ist. Man vermeide einen Ueberschuß von Sublimat, da sonst das an den Innenwänden der Kammer sich niederschlagende Kondenswasser auf die Kulturen herabträufeln kann, dadurch die Keimtrennung hindert und außerdem die Beobachtung stört. Stehen die beiden Schalen ineinander, so überragt die Filtrierpapierscheibe in der oberen Schale allseitig den freien Rand der unteren Schale und schließt damit keimdicht. Statt mit Hilfe der oberen Schale kann man den Verschluß der unteren vermittels einer Glasplatte erzielen. Eine hermetische Dichtung wird nach Dahmen[72] dadurch erzielt, daß man den freien Schalenrand mit einem der Länge nach aufgeschnittenen Gummischlauch umkleidet, auf den die allseitig etwas überragende Glasplatte aufgelegt wird.

Um gekochte Kartoffeln für Nährböden vorrätig zu halten, überzieht Simmonds[380] die aus dem Dampftopf entnommenen Kartoffeln nach der Abkühlung durch Eintauchen in eine Schellacklösung mit einem luftdicht abschließenden Ueberzug. Solche Kartoffeln sollen noch nach Monaten eine feuchte Schnittfläche liefern.

Kartoffelscheiben nach v. Esmarch[96 u. 97].

Die etwas umständliche Herrichtung der feuchten Kammer läßt sich umgehen, wenn man Kartoffelscheiben (nach v. Esmarch) verwendet. Gut geschälte und unter der Wasserleitung gereinigte Kartoffeln werden in Scheiben von $^1/_2$ bis 1 cm Dicke geschnitten. Diese werden in vorher sterilisierte, kleine Doppelschälchen (etwa 6 cm Durchmesser) gelegt und $^3/_4$ Stunden in den Dampftopf gestellt.

Halbierte Kartoffelzylinder nach Bolton[29], Globig[138], Roux[345 u. 346].

Um Kartoffelkulturen in Reagenzgläsern anzulegen, werden mit Hilfe eines sauberen Korkbohrers Zylinder aus Kartoffeln ausgestochen. Nachdem die Schale an beiden Enden entfernt ist, werden die Zylinder in der Diagonale durchschnitten, und die Hälften in sterilen Reagenzgläsern mit Watteverschluß im Dampftopf sterilisiert. Um eine Eintrocknung und dadurch bedingte Verfärbung der Kartoffeloberfläche zu verhindern, bringt man vor der Sterilisation einige Tropfen Wasser auf den Boden des Reagenzglases. Damit die Kartoffelstücke nicht in das Kondenswasser zu stehen kommen, kann man zunächst etwas Watte (Hueppe, Methoden) oder ein Glasstückchen (Günther, Lehrb.) auf den Boden des Reagenzglases bringen oder den unteren Teil des Röhrchens einkerben, so daß das Kartoffelstück auf der Einschnürung ruht (Roux).

Glyzerinkartoffeln stellt man sich in der Weise her, daß man gut gewaschene Kartoffelkeile in 5-proz. Glyzerinwasser einweicht und sie so in Kulturröhrchen einstellt, daß ihr unterer Rand in eine 5-proz. Glyzerinlösung eintaucht.

Anzilotti[3] kocht Kartoffelstückchen in einer 6-proz. Glyzerinlösung, die mit einer gesättigten Lösung von kohlensaurem Natron alkalisch gemacht worden ist, so lange, bis sie ganz weich und stark aufgequollen sind (ca. 20 Minuten). Verändert sich die Reaktion, so muß diese mit Natronlauge wieder hergestellt werden. Die so vorbereiteten Kartoffeln kommen in Rouxsche Gläser über 6-proz. Glyzerinbouillon. Sterilisation bei 120 Grad 20 Minuten.

Durch Mischen von Kartoffelbrei mit Gelatine und Agar lassen sich ebenfalls Nährböden herstellen, die früher besonders für die Diagnose des Typhus Verwendung gefunden haben.

Hueppe (Lehrb.) sterilisierte geriebene Kartoffeln (Kartoffelbrei) im Dampf und gab ihm einen Zusatz von Stärke, Zucker, Pepton oder Fleischextrakt. G. Wood schneidet aus Kartoffeln feine Scheiben heraus, drückt sie auf sterilisierte Glasstreifen an und bringt diese in Reagenzgläser. Sterilisation im gespannten Dampf. Auf diese Weise erhält man einen Kartoffelnährboden in durchscheinender Form.

Durch kurzes Einlegen der Kartoffelstücke in Essigsäure läßt sich die natursaure Reaktion verstärken, durch Behandeln mit Sodalösung wird sie in die alkalische übergeführt. Statt der Kartoffel lassen sich auch andere Früchte verwenden, wie z. B. die Zuckerrüben, die in gleicher Weise vorbereitet werden (Kràl).

Jurewitsch[186] hat eine Kartoffelnährbouillon speziell zur Züchtung der Tuberkelbacillen angegeben: Zerschnittene ausgeschälte Kartoffeln werden zerrieben, 500 g so erhaltener Kartoffelbrei wird mit 500 bis 1000 ccm Wasser versetzt, 1 Tag kalt aufbewahrt, geschüttelt und durch Leinwand gepreßt. Nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde wird das Infus vom Bodensatz abgegossen. — Hiermit wird ein in gewöhnlicher Weise bereitetes Fleischinfus (500 g Fleisch auf 1 l Wasser, nach 24 Stunden durch Leinwand gepreßt) zu gleichen Teilen gemischt, dazu $^1/_2$ Proz. Pepton Witte und $^1/_4$ Proz. NaCl gefügt, 1 Stunde gekocht und filtriert. — Nach weiterem Zusatz von 3 Proz. Glyzerin und gesättigter Sodalösung bis zur ausgesprochenen alkalischen Reaktion wird im Autoklav $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde sterilisiert, filtriert und nochmals sterilisiert.

Als ein Ersatz für Kartoffelnährboden wird von Heinemann[162] folgendes Nährsubstrat empfohlen: In 600 ccm Wasser werden 10 g Agar gelöst. Ferner werden in 200 ccm Wasser je 2 g von Kalium- und Natriumbiphosphat, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid, Ammoniumlaktat und Asparagin gelöst. Beide Lösungen werden heiß miteinander gemischt; dann dem Gemisch noch 10 g Pepton zugefügt. Nach Lösung des Peptons wird filtriert und neutralisiert. Zu dem Filtrat werden 30 g gut gereinigte, fein zerriebene Stärke zugesetzt.

Aus Reisbrei (Soyka[384]), aus Makkaroniteig (Lagerheim[232]) und anderen Substanzen hat man ebenfalls feste Nährböden hergestellt. Brotbrei (2 Teile geriebenes Brot mit 1 Teil Wasser im Erlenmeyerkölbchen fraktioniert sterilisiert) ist ein vorzüglicher Nährboden zur Züchtung von Schimmelpilzen. Schill[361] züchtete auf sterilisierten angefeuchteten Oblaten.

Reiter benutzte Kokosnuß, Uyeda[412] Mannan, das aus den Wurzeln der Konjakupflanze (Conophallus Konjak) gewonnen wird, als Nährboden für Bakterien. Die Konjakutafeln werden entweder ganz sterilisiert und wie Kartoffelscheiben verwandt, oder das Mannan wird in üblicher Weise als Erstarrungsmittel zu Bouillon etc. hinzugegeben.

Herstellung von Nährböden aus Organen.

Gekochte Organe benutzte Lumière speziell zur Züchtung der Tuberkelbacillen. Auch nach Frugoni[120] bilden tierische Gewebe, besonders Lunge des Kaninchens und des Hundes, einen vorzüglichen Nährboden für Tuberkelbacillen: Nach $^3/_4$-stündigem Auskochen im

Autoklaven werden aus den Organen Prismen geschnitten, diese 1—2 Stunden in 6—8-proz. glyzerinisiertes Wasser gelegt und in Glasröhrchen nach System Roux zugerichtet, indem man sie mittels Gummideckels und durch Einführung 6—8-proz. glyzerinisierter Brühe, so daß das Stück bespült wird, vor dem Austrocknen schützt. Kral[222 u. 223] fertigt aus Fleischpulver und Peptonbouillon Fleischscheiben an.

Zinno[442] fügt einem Aufguß von frischem Rinderhirn, der zur Hälfte aus Gehirnbrei und zur Hälfte aus Wasser besteht, 1 Proz. Grüblersches Pepsin und 1 Proz. Salzsäure zu und stellt das Ganze 15 Stunden in einen Thermostaten bei 40—45°. Dann läßt er es 1 Stunde lang kochen, filtriert und neutralisiert bis zu leicht alkalischer Reaktion. Mit dieser Bouillon präpariert man alsdann Agar, Gelatine etc., wie es gewöhnlich mit den anderen Kulturböden geschieht.

Ficker[104] erwärmt fein zermahlenes Hirn mit Aqua dest. āā unter stetem Umrühren zum Kochen, nach $^1/_4$-stündigem Kochen wird koliert. Ohne zu neutralisieren wird mit einer 2,5-proz. Lösung von Agar gemischt, 3 Proz. Glyzerin hinzugefügt und sterilisiert. — Der Nährboden ist speziell für Züchtung von Tuberkelbacillen bestimmt.

Herstellung von Nährböden aus Vogeleiern.

Vogeleier (vor allem Hühnereier) kommen in toto oder auch in ihren Bestandteilen als feste und flüssige, durchsichtige und undurchsichtige Nährböden zur Verwendung.

Am einfachsten ist es, das Ei nach vorheriger Sterilisierung der Schale ohne weitere Präparation als flüssiges Nährmedium zu verwenden (Hueppe, Lehrb.). Frische Eier werden zu dem Zweck nacheinander mit warmem Seifenwasser und Sublimat gebürstet, mit sterilem destilliertem Wasser oder vorher noch mit Ammoniumsulfat abgespült. Dann wird mit ausgeglühter Nadel an einem Pol ein Loch in die Schale gestoßen und durch dieses die Impfung vermittels Platinöse vorgenommen. Ein steriler Verschluß der Impfstelle wird durch Papier mit Kollodium oder Watte oder besser durch Siegellack erzielt.

Will man das Ei ohne Schale, aber mit Schonung des Dotters benutzen, so gießt man nach Zörkendörfer[443] das Eiweiß in einen sterilen Erlenmeyerkolben, legt den Dotter vorsichtig auf die Mündung und stellt das Ganze in Eiswasser. Durch den Luftdruck wird der Dotter in den Kolben hineingetrieben, eventuell kann man durch vorsichtiges Blasen nachhelfen. Danach Watteverschluß. Sterilisation an 3 Tagen 1 bis 2 Stunden lang bei 56°. Lubenau[252 u. 253] vermischte Eigelb mit gleichen Teilen Bouillon und brachte das Gemisch bei 90° zur Erstarrung.

Langstein & Mayer[233] empfehlen das nach Koagulation von Eiereiweiß in der zurückbleibenden Lösung enthaltene Ovomukoid zu Züchtungszwecken. Das Eiklar von 5 Eiern wird in 500 ccm siedenden Wassers unter beständigem Umrühren eingetragen und nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure nochmals aufgekocht. Nach Filtration vom ausgeschiedenen Koagulum wird das Filtrat auf 200 ccm eingedampft, und nach entsprechender Alkalisierung mit Soda in Röhrchen gefüllt und im Dampf sterilisiert. Dabei gewinnt es ein Aussehen ähnlich dem der Nährbouillon.

Um den ganzen Eiinhalt als festen Nährboden zu verwenden, verfährt Wesener[428] so, daß er durch kräftiges Schütteln des frischen Hühnereies Dotter und Eiweiß zunächst gut vermischt. Dann wird der Inhalt des Eies bei 75—80° koaguliert, nach Sterilisation der Schale herausgenommen, in Scheiben zerschnitten und im Dampf sterilisiert.

Zu festen Nährböden wird auch das Eiweiß allein, und zwar in verschiedener Weise verwandt, je nachdem es sich um Herstellung durchsichtiger oder undurchsichtiger Nährböden handelt.

Wird auf die Durchsichtigkeit verzichtet, so verfährt man (Hesse[167], Sakharoff[350]) in der Weise, daß man aus gekochten, geschälten Eiern Eiweißstücke ausschneidet und diese in sterilen Reagenzgläsern mit Watteverschluß im Dampf sterilisiert. Um die Austrocknung zu verhindern, kann man zuvor etwas steriles Wasser in das Reagenzglas bringen.

Zur Bereitung durchsichtiger Eiereiweißnährböden werden von Schenk[356] sowie von dal Pozzo[322] Kibitzeier verwandt, die die Eigenschaft haben, bei Temperaturen von 75° zu einer durchsichtigen Masse zu erstarren. Man entnimmt das Eiweiß steril, vermischt es mit der gleichen Menge Wasser, sterilisiert diskontinuierlich und bringt die Masse zum Erstarren in analoger Weise wie Blutserum.

Durchsichtigkeit des Eiereiweißnährbodens läßt sich ferner durch Ueberführung des Eiweiß in Alkalialbuminat erzielen. Zu diesem Zweck kann man verschiedene Verfahren einschlagen.

Tarchanow[398] brachte Hühnereier in 10-proz. Lösung von Kalihydrat. Nach 4 Tagen wird das veränderte Eiweiß in Reagenzgläser gefüllt und zur Hälfte mit Wasser verdünnt. Dieses sirupartige Alkalialbuminat kann im Dampf sterilisiert werden, ohne fest zu werden. Nach 15 Minuten langer Einwirkung von 105° erstarrt es opaleszierend, bleibt aber noch durchscheinend. Nach 14-tägigem Liegen in der Kalilauge wird das Eiweiß fest und kann in Scheiben geschnitten als Nährboden verwandt werden.

Karlinski[190] brachte die Eier für 14 Tage in 10—20-proz. Kalilauge, nahm die Schale mit ausgeglühter Pinzette ab und schnitt das Eiweiß mit sterilem Messer in Scheiben, die in sterilen Doppelschälchen ohne weiteres als Nährboden benutzt wurden.

Rosenthal & Schulz[338] preßten frisches Eiereiweiß durch Musseline. Auf je 5 Eiweiß Zusatz von 3 ccm 1-proz. Kali- oder Natronlauge. Die Substanzen bleiben in einem Maßzylinder mit Glasstöpsel einige Stunden stehen und werden durch wiederholtes Neigen des Zylinders vermischt (Schütteln wegen störender Schaumbildung vermeiden!). Einfüllen der Mischung in sterile Reagenzgläser; Erhitzen bei 95 bis 98° im Wasserbad; dabei gerinnt das Eiweiß zu einer durchsichtigen, höchstens leicht opaleszenten Gallerte. (Temperaturerhöhung auf 100° ist zu vermeiden, weil die dann in Blasen entweichenden Wasserdämpfe die Gallerte zerreißen.) Man kann durch Ersatz eines Teiles des Wassers durch Bouillon den Nährstoffgehalt dieses Bodens erhöhen.

Der Eidotter bewirkt als Zusatz zu Agar (mehrere Oesen auf ein Röhrchen) nach Capaldi[56] eine Verbesserung des Nährbodens für viele Mikroorganismen.

Ein begünstigendes Wachstum mancher Arten auf Nährböden wird durch die Symbiose mit andern Bakterien bewirkt. Turro[106] fand

z. B. ein besonders üppiges Wachstum des Streptococcus in Kulturen, die gleichzeitig Cholera, Pyocyaneus und Milzbrand enthielten.

Zur Züchtung von Mikroorganismen in strömenden Flüssigkeiten (um die Verhältnisse im strömenden Blut nachzuahmen) hat Weleminsky[424 u. 425] einen Apparat angegeben, der im wesentlichen aus zwei auf einer wiegenden Unterlage befestigten Kolben besteht, die miteinander durch 2 Röhren so kommunizierend verbunden sind, daß jeweils die eine an der unteren Seite des einen Kolbens beginnend, an der oberen Seite des anderen endet. In den Röhren findet beim Wiegen der Kolben durch einen Motor eine ständige regelmäßige Zirkulation statt.

Während die bisher behandelten Zusätze nur eine Verbesserung des Nährbodens bezweckten, sollen andere dazu dienen, gewisse Umsetzungsprodukte der Bakterien mit dem Nährboden nachzuweisen oder fermentative und andere Eigenschaften der Bakterien zu eruieren (Näheres hierüber siehe Kap. 6).

Die speziell zur Züchtung einzelner Bakterienarten angegebenen Nährböden.

Soweit die im vorhergehenden beschriebenen Nährböden von den gewöhnlichen in ihrer Zusammensetzung abweichen, handelt es sich um Zusätze oder Ersatzmittel, die zu dem Zweck angewandt wurden, das Wachstum einer sonst schwer oder gar nicht züchtbaren Species zu erleichtern respektive zu ermöglichen, ohne daß beabsichtigt wurde, damit das Wachstum anderer Arten zu hemmen oder ganz zu hindern. So ist ein Zusatz von Blut zu Agar für das Wachstum des Influenzabacillus, ein solcher von Glyzerin für ein gutes Fortkommen des Tuberkelbacillus nötig; andere pathogene Keime werden dagegen durch diese Zusätze in ihrem Wachstum nicht gehemmt.

Das Bestreben der Bakteriologen ist aber von jeher darauf gerichtet, für die Züchtung pathogener Keime, die im Tierkörper oder an Orten ihres Vorkommens in der unbelebten Natur, häufig mit anderen Arten vermischt auftreten, spezifische Nährmedien zu finden. Das sind einerseits solche Böden, auf denen das Wachstum der gesuchten Art ausschließlich oder doch ganz überwiegend erfolgt und gerade die als Begleitbakterien in Betracht kommenden Arten keine oder nur sehr ungünstige Bedingungen ihres Fortkommens antreffen. Auf der anderen Seite beabsichtigt man neben einer partiellen Wachstumshemmung das Auftreten besonders differenter und charakteristisch aussehender Kolonieformen der verschiedenen Arten und damit Erleichterung der Isolierung.

Es ist leider für keine einzige pathogene Bakterienart bis heute ein Nährboden gefunden, der die gewünschten Ziele ganz erreicht, wenn auch manche, wie der Choleranährboden von Dieudonné, ihnen nahe kommen.

Hier seien die wichtigsten Spezialnährböden angeführt, im übrigen müssen die betreffenden Kapitel des Handbuchs eingesehen werden.

Tuberkelbacillen.

a) Hirnnährboden nach Ficker (siehe S. 410).

b) Heydenagar nach Hesse:

5 g Nährstoff Heyden wird in 50,0 ccm Wasser aufgelöst, dazu 5,0 g NaCl, 30 g Glyzerin, 10—20 g Agar, 5 ccm Normalsoda-

lösung, 950 g Aqua dest., kochen 15 Minuten, filtrieren, sterilisieren, ausgießen in Petrischalen.

c) Bruschettini[41] schlägt folgenden Nährboden vor:

Gewöhnliche Kalbfleischbouillon	100 ccm
Defibriniertes Kaninchen- oder Hundeblut	10 „
Eidotter	5 „

Auf diesem Boden entwickelt sich der Tuberkelbacillus rasch.

d) Szaboky[397] empfiehlt folgenden Nährboden: 1 kg Lungen werden in 2 Liter Wasser gekocht, 10 g Agar, 10 g NaCl, 20 g Pepton (Witte), 100 g Glyzerin, 10 g Traubenzucker. Kochen, Filtrieren, Einstellen auf Lackmusneutralität.

e) Verfahren nach Cantani (siehe S. 406).

f) Verfahren nach Anzilotti (siehe S. 408).

g) Verfahren nach Jurewitsch (siehe S. 409).

h) Verfahren nach Lumière und Frugoni (siehe S. 409).

i) Die Uhlenhuthsche Methode zur Reinzüchtung der Tuberkelbacillen: 20—30 ccm Sputum werden mit 15 ccm Antiformin gemischt und die Gesamtmenge sofort auf 100 ccm aufgefüllt, so daß eine 15-proz. Antiformin-Sputummischung resultiert. Nach 2—5 Stunden werden die nicht gelösten Partikelchen herausgefischt oder die Mischung zentrifugiert, und die klare Flüssigkeit vom Bodensatz abgegossen. Dieser wird mit 10 ccm steriler 0,8-proz. Kochsalzlösung gemischt, zentrifugiert, die klare Flüssigkeit wieder abgesaugt, nochmals mit Kochsalzlösung gemischt, zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Bodensatz werden dann je 4—5 Oesen auf mehreren Röhrchen Glyzerinagar verrieben und bei 37 Grad bebrütet.

k) K. Spengler[387] bringt eine große Sputumflocke in die Flamme, erwärmt bis sich das Sputum aufbläht und verimpft auf Glyzerinblutserum. Nach 8—14 Tagen wird die Kultur auf Blutglyzerinagar weiter geimpft (siehe auch f unter Diphtheriebacillen, S. 414).

l) Das ebenfalls von Spengler angegebene Formalinverfahren besteht in folgendem: „10 Tropfen Formalin (0,5 g) läßt man vom Schalendeckel einer Petrischale aus $^1/_2$ Stunde bei 20° auf das in der unteren Schale befindliche Sputum einwirken. Es entwickeln sich ausnahmslos Tuberkel- oder Perlsucht- oder Smegmabacillen in den Kulturen; alle übrigen Bakterien aber im Sputum sind abgetötet." Zarte Bestreuung des Sputums mit Pankreatinpulver erleichtert die Anreicherung und Züchtung. Das auf die geschilderte Weise von den Begleitbakterien befreite Material wird auf folgenden Nährboden übertragen: Nährstoff Heyden 5,0 g, Somatose 5,0 g, Chlornatrium 5,0 g, Glyzerin 30,0 g, Agar 15,0 g, Soda crystal. 2—4 g, Aqua dest. 1000 ccm.

Diphtheriebacillen.

a) Löffler-Serum (siehe S. 406).

b) Serumagar nach Tochtermann (siehe S. 406).

c) Bosse[33] hat für die Züchtung der Diphtheriebacillen den Deyckeschen Pepsin-Trypsinagar empfohlen. Seine Herstellung ist die folgende:

150 g zerkleinertes Pferdeherz
3 g frisches Pepsin Witte-Rostock
400 ccm Aqua destillata
2 ccm 50-proz. Salzsäure

2 Tage bei 37° verdauen lassen, filtrieren, Prüfung einer Probe des Filtrates auf die Biuretreaktion, die positiv ausfallen soll, versetzen mit 3,9 g Natrium carbonicum siccum.

Herstellung einer Trypsinlösung, indem man feinzerschnittenes Schweinepankreas nach 24 Stunden Aufenthalt im Eisschrank mit 40 ccm Glyzerin und 160 ccm Aqua dest. versetzt und einige Tage extrahiert. (Nach Zusatz eines kleinen Stückchens Kampfer hält sich der ausgepreßte Saft im Eisschrank.) Von dieser Lösung werden 15 ccm obigem Filtrat zugesetzt, 6 Stunden bei 37° gehalten, sofort im Dampftopf sterilisiert und mit Salzsäure neutralisiert. —

Weiterer Zusatz von 1950 g Wasser, 6 g NaCl, 39 g Agar-Agar, 3 Stunden kochen, im Damptopf durch Watte filtrieren, auf Kölbchen füllen und sterilisieren. —

d) Glyzerinblutagar nach Mandelbaum & Heinemann[257]. Die in gewöhnlicher Weise hergestellten Glyzerin-Agarplatten werden mit Menschenblut bestrichen. (Diphtheriebacillen hell mit braungelblichem Hof, Pseudodiphtherie- und Xerosebacillen rot.)

e) Bronstein & Grünblatt[39] machten zur Differentialdiagnose der echten Diphtheriebacillen und Pseudodiphtheriebacillen von der Tatsache Gebrauch, daß der Diphtherieerreger Säure bildet, der Pseudodiphtheriebacillus dagegen nicht. Als geeigneter Indikator zum Nachweis der Säure resp. Alkalibildung in Bouillonkulturen erwies sich das von Mankowski zur Differentialdiagnose von Typhus und Coli angegebene Reagens, das die Autoren mit geringer Modifizierung der ursprünglichen Vorschrift wie folgt bereiteten: Lösung a: 2-proz. wäßrige Indigokarminlösung, Lösung b: 10,0 Säurefuchsin in 100,0 1-proz. Kalilauge gelöst. Zum Gebrauch werden 2 Teile der Lösung a und 1 Teil der Lösung b zu 22 Teilen Aqua dest. hinzugegeben. Mit dieser Mischung als Indikator wird Fleischpeptonbouillon mit $^1/_2$ Proz. Glukose bei 37° auf den Neutralpunkt eingestellt. Die Einstellung erfolgt unmittelbar vor der Endsterilisation, und die Bouillon ist möglichst frisch zu benutzen. Je 5 ccm der neutralen Bouillon werden in Reagenzgläsern mit den betreffenden Kulturen beimpft und mit einer ungeimpften Kontrolle für 24 Stunden in den Thermostaten gebracht. Nach dieser Zeit werden jedem Reagenzglas noch drei Tropfen Mankowskischen Reagens zugesetzt. Die sterile Bouillon färbt sich blau, die mit Löfflerschen Diphtheriebacillen rubinrot, die mit Pseudodiphtheriebacillen (nach einigen Minuten) grün. Nach weiteren 12 Stunden nehmen auch die Pseudodiphtheriebacillen rote Farbe an.

f) Lubenau[253] ersetzt das bei den Nährböden für die Kultur von Tuberkelbacillen und Diphtheriebacillen verwendete Serum durch Eigelb und verfährt hierbei in folgender Weise: Die Eier werden zuvor zwecks Sterilisation mit heißem Seifenwasser abgewaschen, in Alkohol gelegt, nach einiger Zeit herausgenommen und der Alkohol nach Abtropfen abgebrannt. Von dem Inhalt gelangt nur das Eigelb zur Verwendung; man gewinnt es, indem man in das Ei ein Loch schlägt, das Eiweiß ablaufen läßt, und dann gegebenenfalls unter Erweiterung der Oeffnung das Eigelb abläßt. Geringe Mengen von Eiereiweiß, die sich dem Eigelb beimischen, schaden nichts. Das Eigelb von 5—6 Eiern wird, um eine gute Verteilung untereinander und später mit der Bouillon zu erzielen, in einem Kölbchen kräftig geschüttelt; dann gibt man 100 ccm gegen Lackmus mit Soda neu-

tralisierte Fleischwasserbouillon hinzu, die für die Kultur von Diphtheriebacillen 1 Proz. Traubenzucker, für Tuberkelbacillen 3 Proz. Glyzerin enthalten muß. Nach nochmaligem Durchschütteln wird die Mischung in Röhrchen abgefüllt und im Serumapparat bei 90° durch dreimaliges 2—3-stündiges Erhitzen zum Erstarren gebracht.

Typhusbacillen.

Die folgenden Nährböden beruhen meist auf dem Prinzip, eine Differenzierung durch die Säurebildung des Colibacillus und die Alkalibildung seitens des Typhusbacillus zu erzielen.

a) Lackmusnutroseagar nach v. Drigalski & Conradi: 1,5 kg gehacktes Pferdefleisch mit 2 l Wasser 24 Stunden stehen lassen, das abgepreßte Fleischwasser 1 Stunde kochen, filtrieren; Hinzufügen von 20 g Pepton, 20 g Nutrose, 10 g NaCl, 1 Stunde kochen, filtrieren, Zusatz von 60—70 g Agar, 3 Stunden im Dampfstrom oder 1 Stunde im Autoklaven kochen, gegen Lackmuspapier schwach alkalisieren, filtrieren, $^1/_2$ Stunde kochen. Zusatz von 40—50 Grad warmer Lackmusmilchzuckerlösung (Lackmuslösung von Kahlbaum-Berlin 10 Minuten kochen, dann Zusatz von 30 g Milchzucker, 15 Minuten kochen). Zu dieser Mischung wird eine Lösung von 10 Proz. wasserfreier Soda gesetzt, bis der beim Schütteln entstehende, rote Schaum blauviolett wird. Weiterer Zusatz von 20 ccm der folgenden Lösung: 0,1 g Kristallviolett B (Höchst) in 100 ccm Wasser. Ausgießen in Drigalskischalen, Trocknen, Impfen. (Typhus- und Paratyphuskolonien blau, glasig, tautropfenähnlich, Colikolonien leuchtend rot, nicht durchsichtig.)

Hagemann[146] verwendet statt des Zusatzes von Nutrose (Kaseinnatrium) und des Milchzuckers Milch, aus der diese beiden Stoffe gewonnen werden.

b) Zielleczky[441] empfiehlt folgenden Phenolphthaleinnährboden: $^1/_2$ g Phenolphthalein wird in 100 ccm einer Mischung von Wasser und Alkohol āā gelöst. Von dieser Stammlösung wird eine vor dem jemaligen Gebrauch frisch zu bereitende, 20-fache wäßrige Verdünnung hergestellt und davon werden 0,1 bis 0,5 zu je 5 ccm Bouillon, 1,0 zur gleichen Menge Agars zugesetzt, Sterilisation. Auf diesem Nährboden bewirkt Coli schon in 5 bis 8 Stunden (Bouillon) resp. 8 bis 9 Stunden (Agar) eine Entfärbung, während der Eintritt der Reaktion bei Typhus erst erheblich später (15 Stunden) erfolgte.

c) Omelianski[293 u. 294] verwendet phenolphthaleinhaltige Nährboden mit Zusatz von ameisensauren Alkalisalzen zur Differenzierung. (Typhusbacillen erst schwach rosa-gelblich, später ziegel- oder fleischrot, Colibacillen rübensaftrot).

d) Fuchsinnährboden nach Endo[90a]: 1 l 3-proz. Nähragar wird neutralisiert und mit 100 ccm 10-proz. Sodalösung alkalisiert, mit 10 g Milchzucker und 5 ccm gesättigter alkoholischer Fuchsinlösung und 25 ccm 10-proz. Natriumsulfidlösung versetzt. Der Nährboden soll in der Platte die Farbe des natürlichen Agars haben, allenfalls leicht rosa gefärbt sein. (Typhus und Paratyphus wächst farblos bis leicht rosa, Coli intensiv rot.)

Clauditz[60] und Gaethgens[127] empfehlen den Endoagar besonders in Kombination mit dem Fickerschen Anreicherungsverfahren.

Von der Firma Merck-Darmstadt sind Endotabletten zu beziehen, die gewöhnlichem Nähragar oder Ragitagar zugesetzt werden.

e) Koffeinnährboden nach Roth, Ficker, Hoffmann[342]: 100 ccm Rindfleischwasser werden mit 6 Proz. Pepton und 0,5 Proz. NaCl vermischt und mit 38,64 Proz. der zur Neutralisierung bis zur Phenolphthaleinrotfärbung nötigen Menge Normal-NaOH versetzt. 10 Minuten im Dampf sterilisiert, Zusatz von 105 ccm einer 1,2-proz. Koffeinlösung und 1,4 ccm einer 0,1-proz. Kristallviolettlösung. Nach 13-stündigem Bebrüten des beimpften Nährbodens bei 37° Aussaat auf Drigalskiagar.

f) Löfflers[250] Malachitgrün-Safranin-Reinblauagar: 1 l 3-proz. neutraler Nähragar wird mit 5 ccm Normal-NaOH, 100 ccm 10-proz. Nutroselösung vermischt und durch Absetzenlassen geklärt. Zum Gebrauch wird zu 100 ccm des verflüssigten und auf 45° abgekühlten Agars 3 ccm durch Kochen sterilisierte und filtrierte Rindergalle, 1 ccm 0,2-proz. wäßriger Lösung von „Safranin-Rein" (Dr. Grübler), 3 ccm 1-proz. wäßriger Lösung von „Reinblau doppelt konzentriert" (Höchst) und 3—4 ccm einer 0,2-proz. wäßrigen Lösung von „Malachitgrün krist. chem. Rein" (Höchst) gemischt. Ausgießen auf Platten. (Typhuskolonien blau durchscheinend, flach mit unebener Oberfläche und Metallglanz; Paratyphus B sehr ähnlich; Paratyphus A rund, glashell, bläulich; Bac. Gärtner rund, saftig, rot; Colikolonien rot oder rötlich.)

g) Vial[417] empfiehlt die Verwendung nur reiner Malachitgrünpräparate (Oxalate) und, um die Wirkung auf Typhus abzuschwächen, einen Zusatz von 1 Prozent Dextrin.

h) Peabody & Pratl[303] reichern die Typhusbacillen in folgendem Nährmedium an: Herstellung einer Bouillon aus Rindfleischwasser. Nach dem Sterilisieren zu je 100 ccm heißer Bouillon Zusatz von 10 ccm einer etwa 0,1-proz., mit sterilem Wasser hergestellten Malachitgrünlösung (die Säure des Nährbodens entspricht für 100 ccm Agar $^1/_2$ ccm Normal-NaOH) und Verteilen in Reagenzgläsern in Portionen von je 10 bis 15 ccm. Ein Faecesaufschwemmung wird bei festen Stühlen durch Aufschwemmung mit dem gleichen Volumen steriler physiologischer Kochsalzlösung gewonnen und zu einem Röhrchen Malachitgrünbouillon werden je 2 Tropfen Faecesaufschwemmung hinzugefügt. Nach 18- bis 20-stündigem Wachstum im Brutofen werden hiervon Drigalski-Conradi-Platten angelegt.

i) Verfahren von Lentz & Tietz[237 u. 238]: Auf einer Malachitgrünagarplatte, die wie bei f bereitet, aber ohne Safranin und Reinblau, mit 3 ccm Rindergalle und 1,9 ccm der 0,2-proz. Malachitgrünlösung auf 100 ccm Nutrosenähragar erfolgt die Anreicherung; 24-stündiges Bebrüten, Abschwemmen der Platte mit 10 ccm 0,8-proz. Kochsalzlösung, Aussaat auf Drigalskiagar.

k) Verfahren von Conradi: 900 ccm Wasser, 30 g Agar, 20 g Liebigs Fleischextrakt, 100 ccm einer 10-proz. wäßrigen Witte-Peptonlösung. (Der Zusatz der filtrierten und sterilisierten Peptonlösung erfolgt nach Beendigung der Sterilisation und Filtration des Agars.) Ansäuern 3 Proz. über den Phenolphthaleinneutralpunkt. Zu $1^1/_2$ l Agar werden je 10 ccm einer 1-prom. wäßrigen Lösung von Pikrinsäure (Grübler) und einer 1-prom. wäßrigen Lösung von Brillantgrün kristall. extra rein zugesetzt und nochmals sterilisiert.

(Typhus glattrandig, grün, rundlich, mit 10-facher Vergröß. deutlich körnige Struktur; Paratyphus üppiger, hellgrünlich.)

l) Verfahren von Padlewsky[296] u.[297]: Zu 3 Proz. Fleischagar mit 2 Proz. Pepton (schwach alkalisch) kommt 1 Proz chemisch reiner Milchzucker und 3 Proz. Ochsengalle. Abfüllen auf Kolben zu 100 ccm, 3 Tage je $^1/_2$ Stunde bei 100° sterilisieren. Ferner bereitet man

a) 1-proz. wäßrige Lösung von kristallinisch chem. reinem Malachitgrün,

b) 10-proz. wäßrige Lösung von schwefelsaurem Natrium.

Zu 100 ccm des Nährbodens werden zugesetzt: 0,5 der Lösung a, 0,75—1,0 der Lösung b, und 0,5 ccm Ochsengalle. (Typhusbacillen erst farblos, dann gelbgoldig durchscheinend, Colibacillen grün.)

m) Rothberger[342a] empfiehlt zur Differenzierung von Typhus- und Colibacillen Nähragar mit Neutralrot zu vermischen Heller[164] statt Agar Gelatine.

Oldekop[292] empfiehlt den folgenden Nährboden: 1,5 g Agar, 5,0 Liebigs Fleischextrakt, 2,5 Kochsalz, 500 ccm Wasser, Alkalisieren mit Soda, Hinzufügen von 1—2 ccm konz. Neutralrotlösung.

n) Verfahren von Kindborg[202]: Neutraler, 3-proz. Fleischwasseragar wird in kleinen Portionen zu 200 ccm vorrätig gehalten. Zusatz von 5 Proz. Milchzucker, Erhitzen im Wasserbad bis völlige Lösung. Zusatz von Säurefuchsin (5 ccm einer gesättigten wäßrigen Lösung) zu 100 ccm Agar und Malachitgrün Ia (4 ccm einer Normallösung von 1:120).

o) Werbitzki[427] und Mc. Weenie[426] setzen zum Nährsubstrat Chinagrün, das die Entwickelung der Colibakterien beinahe völlig hemmt.

p) Bernstein[18] setzte zwecks Differenzierung der Typhus- und Colibakterien Kohlehydrate zum Nährboden.

q) Bitter[25] empfiehlt eine Kombination von Chinablau und Malachitgrün-Zusatz.

r) Hammerschmidt[149] reichert die Typhusbacillen mit Kreosolwasser an.

s) Fichtner[103] stellt den Drigalskiagar mit 2 Proz. Agar her, nimmt keine Nutrose und setzt anstatt Lackmustinktur auf 100 g Nähragar 0,04 Arolithmin.

t) Schuhmacher[371] kombiniert ein Endo-Malachit-Plattenverfahren mit dem Conradischen Brillantgrünpikrinsäure-Agar.

u) Wiens[430] empfiehlt zur Anreicherung der Typhusbacillen ein Dextrose-Peptonwasser.

v) Guth[143] bevorzugt einen Laktose-Fleischwasseragar mit Alizarinzusatz, auf dem Säurebildner eine Gelbfärbung bewirken, Typhusbacillen blaue Kolonien bilden.

w) Piorkowski[316–317] differenziert Typhusbacillen vom Bac. faecalis alcaligenes mit Harngelatine.

Krause[221] hat den Piorkowskischen Harn-Gelatinenährboden in folgender Weise verbessert: 1 Teil 3-proz. Peptonfleischwasseragar und 2 Teile 20-proz. Fleischwassergelatine, beide mit 0,7 Proz. Kochsalzgehalt, werden in einem Kolben gut gemischt, bei 70 bis 80 Grad auf dem Wasserbade auf ihre Reaktion austitriert und bis zu dem gewünschten Reaktionsgrad durch Zusatz von Normal-Milchsäure resp. Normal-Natronlauge gebracht. Zusatz von 2,5 Proz. reinen,

in möglichst wenig Wasser gelösten Harnstoffs und Einfüllen von je 10 ccm in Reagenzgläser. Sterilisation 15 Minuten lang und nochmalige Herstellung der Reaktion. Die Verflüssigung zum Plattengießen erfolgt wegen des Harnstoffgehalts möglichst schonend durch Einstellen der Röhrchen für 2 bis 3 Minuten in kochendes Wasser. Die bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank erstarrten Platten werden bei 35 bis 37 Grad bebrütet. (Tiefliegende Typhuskolonien schimmernd grau, ältere Kolonien bräunlich. Colikolonien runder, grobgekörnter, größer und dunkler als die von Typhus.)

x) Um Pseudotyphusbacillen und Colibakterien von Typhusbacillen zu trennen, läßt Trapani[403] reines neutrales Glyzerin 48 Stunden bei Zimmertemperatur auf die Bakterien einwirken. Die Pseudotyphusbacillen und Colibakterien bleiben unbeeinflußt, während die Entwickelung der Typhusbacillen gehemmt wird.

y) Nieter[285] empfiehlt zur Erkennung des Metatyphus den von Mandelbaum angegebenen Glyzerinblutagar: 5 ccm 6-proz. Glyzerinagar wird mit 2 ccm defibrinierten Menschenblutes (auch Kaninchen- und Hammelblut gibt gute Resultate) gemischt und in Platten gegossen. Bei Metatyphus sehr schwache oder keine Umwandlung des Hämoglobins, bei Typhus, Paratyphus, Coli ausgesprochen schwärzliche Verfärbung. Bei Zusatz von einigen Tropfen Rosolsäure wächst Typhus gelb, Metatyphus rot.

z) Das Chatterjee[58]-Verfahren verwertet die Erscheinung, daß sich beim Wachstum des Typhus und Colibacillus Stoffe bilden, die eine weitere Entwickelung des artgleichen Keimes hemmen: 3—4 Tage alte Typhuskulturen werden mit steriler NaCl-Lösung abgeschwemmt, die von der Kultur befreite Agaroberfläche wird wieder beimpft: sämtliche Bakterien wachsen, nur nicht der Typhusbacillus.

aa) Hirschbruch & Schwer[176] verwenden den v. Drigalski-Conradiagar in folgender Modifikation: 20 g Agar, 10 g Liebigs Fleischextrakt, 10 g Pepton, 5 g Kochsalz werden mit 1000 ccm Leitungswasser $2^1/_2$ Stunden gekocht, filtriert und wieder eine halbe Stunde gekocht. Nach Zusatz von 15 g Milchzucker wird $^1/_4$ Stunde gekocht und soweit alkalisiert, daß die Blaufärbung von rotem Lackmuspapier deutlich, etwas tiefere Bläuung von blauem Lackmuspapier gerade bemerkbar ist. Weiter Zusatz von 130 ccm Lackmuslösung, die $^1/_2$ Stunde gekocht hat, und von 10 ccm heißen sterilen dest. Wassers. An Stelle der Lackmuslösung benutzten Hirschbruch & Schwer später den Farbstoff des Lackmus, das Azolithmin.

Eine Differenzierung von Typhus- und Colibakterien kann ferner durch Beimpfung von Petruschkys Lackmusmolke vorgenommen werden. Ihre Herstellung geschieht folgendermaßen: Ausfällen des Kaseins aus frischer Milch durch schwaches Ansäuern mit verdünnter Salzsäure, Kochen des Filtrates, nochmaliges Filtrieren und Vermischen der neutralisierten Flüssigkeit mit Lackmuslösung. (Colibakterien produzieren in 48 Stunden aus 10 ccm Molke 8 ccm $^1/_{10}$ Normalsäure, Typhusbacillen nicht über 3,0. — Rotfärbung und Trübung bei Coli, rötlich-violette Färbung und Klarbleiben bei Typhus, Blaufärbung bei Bact. alcaligenes.)

bb) Der Nährboden von Barsiekow[9] besteht aus Nutrose und Milchzucker āā 1,0, NaCl 0,5, Aqua dest. 100,0 und einem Zusatz von Lackmus. (Colibakterien zeigen starke Säureblidung. Typhus und Dysenterie nicht.) Ersetzt man Milchzucker durch Traubenzucker,

so ist zwischen Coli und Typhus kein Unterschied zu bemerken: beide zeigen starke, Dysenterie schwache Säurebildung und keine Gerinnung (Klopstock[214]).

Hetsch[172] empfiehlt unter Benutzung der von Barsiekow und Klopstock angegebenen Prinzipien einen Mannit- und Maltosennährboden, der wie folgt hergestellt wird: 10 g Nutrose werden mit 5 g Kochsalz und 1 Liter dest. Wasser 2 Stunden lang gekocht, außerdem werden 5 g Lackmuslösung mit 20 g Mannit, beziehungsweise 25 g Maltose, 10 Minuten lang gekocht, beide Lösungen läßt man auf ca. 50 Grad abkühlen, mischt sie gut miteinander, füllt sie in sterile Reagenzgläser und sterilisiert 15 Minuten. Der Mannitnutrosenährboden hat eine bläulich-violette, der Maltosenutrosenährboden eine mehr rot-violette Farbe. Nach 24-stündigem Wachstum im Gärungskölbchen Prüfen auf Säure bzw. Alkalibildung, Gasbildung, Koagulation des Kaseins der Nutrose.

Zur Isolierung der Typhusbacillen aus dem Blut benutzt Conradi[63] sterile Rindergalle: 0,5 ccm Patientenblut wird in 1 ccm mit 10 Proz. Pepton und 10 Proz. Glyzerin versetzter Rindergalle aufgefangen (Typhusgallenröhren bei Lautenschläger-Berlin erhältlich). Nach ca. 24 Stunden Aussaat auf Drigalski- oder Endoplatten.

Kayser[195–198] mischt 2,5 ccm Patientenblut mit 5 ccm bei 110° sterilisierter Rindergalle (ohne jeden Zusatz). Bebrütung bei 37° und Aussaat (Typhusgallenröhren bei der Firma Merck-Darmstadt erhältlich).

Fornet[106], Sachs-Müke[349] verteilt in der Kayserschen Gallenröhre Blutgerinnsel.

Kirstein[205 u. 206] mischt den Blutkuchen in 5 ccm sterilisierter Rindergalle, der 0,1—0,3 ccm Trypsin-Glyzerinlösung (Dr. Grübler-Leipzig) zugesetzt ist.

Schüffner[369] setzt die Galle dem Nährboden selbst zu: Bouillon und Rindergalle wird zu gleichen Teilen vermischt, mit 2 Proz. Agar, $1^1/_2$ Proz. Gelatine, 1 Proz. Pepton, 1 Proz. Nutrose, 1 Proz. Traubenzucker, $^1/_2$ Proz. NaCl versetzt und schwach alkalisiert. Zu 15 ccm dieser Mischung wird $1^1/_2$ ccm Blut hinzugefügt und in Platten ausgegossen.

Meyerstein[269–271] verwendet anstatt Galle gallensaure Salze zur Anreicherung: 1—2 Messerspitzen Natr. glycocholicum werden in sterilem Reagenzglas mit 2—4 ccm Blut gemischt und 12—16 Stunden bebrütet, hierauf Aussaat (in Ampullen mit Glyzerin āā vermischt, von der Firma Kahlbaum-Berlin in den Handel gebracht, hiervon 4—5 Tropfen auf 2—3 ccm Blut).

Roosen-Runge[339 u. 340] setzt das Gallensalz direkt zum Nährboden: 1 l Bouillon von 0,5 kg Ochsenfleisch wird mit 20 g Agar, 10 g Pepton, 5 g Natriumchlorid und 10 g Natr. glykoch. vermischt und schwach alkalisiert.

Fritz Meyer[268] reichert in Bouillon an, Gildemeister[134] in destilliertem Wasser.

Müller und Gräf[278] konnten feststellen, daß die Typhusbakterien innerhalb des Blutgerinnsels vor Schädigung bewahrt bleiben und verrieben daher die eingesandten verdächtigen Blutgerinnsel direkt auf Lackmus-Milchzuckeragar.

Kier-Petersen und Kirstinn Björnsen[201] züchten im Blut befindliche Typhusbacillen auf folgenden Nährböden: 2 Proz. Peptonlösung, $1^1/_2$ Proz. oxalsaures Natron, 2 Proz. weinsaures Natron und 5 Proz. Glyzerin (100 ccm auf 10 ccm Blut).

Die Isolierung von Typhusbacillen aus Roseolen geschieht nach Reinigen der Haut mit Alkohol und Aether und leichten Einschnitt in die Roseole mittelst feinen Messers. Noch vor Austritt von Blut wird etwas Gewebssaft abgeschabt und in Bouillon übertragen. Die Identifizierung der gewachsenen Bacillen geschieht in üblicher Weise. Stets sollen mehrere und nur frische Roseolen untersucht werden.

Cholerabacillen.

Zur Anreicherung verwendet man Peptonwasser: 1—2 Proz. Pepton, $^1/_2$—1 Proz. Kochsalz in 100 ccm Aqua dest.

Heim[157u. 158] benutzte als Nährflüssigkeit ein Blutdekokt, das sich sowohl für das Anreicherungsverfahren in Flüssigkeiten wie zur Züchtung der Cholerabakterien überhaupt gut eignet. Blutkuchen oder Gesamtblut wird mit der gleichen Menge Wasser in den Dampftopf gebracht, heiß durch ein Tuch koliert und filtriert. Die so gewonnene Nährflüssigkeit besitzt schwach alkalische Reaktion; Sterilisation diskontinuierlich oder im Autoklaven; die Nährflüssigkeit wird mit Agar oder Gelatine (in diesem Falle nochmalige Alkalisierung) zu festen Nährböden weiter verarbeitet. Zusatz von 50 ccm Blutdekokt zu 200 ccm Wasser mit 4 g Pepton und 2 g Kochsalz bewirkt ein stärkeres Wachstum eingeimpfter Choleravibrionen als die einfache Peptonwasserkochsalzlösung.

Der Dieudonnésche[77 u. 78, 95] Blutalkaliagar: defibriniertes Rinderblut mit gleichen Teilen Normalkalilauge vermischt, wird $^1/_2$ Stunde in Dampf sterilisiert. Hiervon 30 Teile zu 70 Teilen gewöhnlichen neutralen Nähragars hinzugefügt und in Schalen ausgegossen (Choleravibrionen wachsen üppig, Coli schwach oder gar nicht).

Hachla und Holobut[144] ziehen das Blut von Schweinen und Pferden für die Herstellung dieses Agars vor.

Pergola[307 u. 308] empfiehlt Blutalkaligelatine.

Besser[20] benutzt zum Choleranachweis einen Drigalski-Conradiagar ohne Nutrose und mit nur 2 Proz. Agargehalt.

Crendiropoulo und Panayotatou[69] verwenden alkalischen Peptonagar, Ottolenghi[295] hebt die Wachstum befördernde Wirkung der Ochsengalle für Choleravibrionen hervor.

Prausnitz[324] zieht zur Differenzierung von Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen eine 10-proz. Aufschwemmung von Hammelblut in Fleischextraktagar heran.

Ein sehr charakteristisches Wachstum zeigen die Choleravibrionen auch auf der Deykeschen Alkalialbuminatgelatine (zit. nach Abel). Alkalialbuminat, von E. Merck-Darmstadt zu beziehen oder folgendermaßen herzustellen: 1 kg feingehacktes fettfreies Kalbfleisch 48 Stunden mit 1200 ccm 3-proz. KOH bei 37°, dann einige Stunden bei 60 bis 70° halten. Saft abfiltrieren und mit verdünnter HCl versetzen, bis keine Fällung mehr entsteht. Den abfiltrierten Niederschlag in soviel konzentrierter Sodalösung, daß die Lösung schwach alkalisch wird, im Dampfstrom lösen. Lösung eindampfen, Rückstand bei 100° zu Pulver trocknen. 2—3 g dieses Pulvers oder des käuflichen A. ist

zu verarbeiten mit 1 g Pepton, 1 g NaCl, 10—15 g Gelatine und 100 g Aq. zu Nährgelatine. Neutralisieren mit HCl, alkalisieren mit $^2/_3$ Proz. kristall. Soda.

Meningokokken.

Ascitesagar, Serumagar, Blutagar, Löfflerserum (siehe oben).

Kutscher[230] stellte aus menschlicher Placenta, Rinderserum und Traubenzucker ein dem Ascitesagar gleichwertiges Nährsubstrat her.

Conradi[66] zentrifugiert die bei der Lumbalpunktion gewonnene Flüssigkeit, erwärmt den flüssigen klaren Teil des Zentrifugates auf 45°, mischt mit 3 Teilen gleichwarmen schwach alkalischen Nähragars, gießt Platten und besät mit dem Bodensatz des Zentrifugates.

Kalberlah[187] fängt die Spinalflüssigkeit in Löfflerserum, Bruynoghe[44] in Nährbouillon auf.

Esch[94] empfiehlt Hammelblut-Maltose-Ascitesagar: 60 ccm Peptonagar (1 Proz. Pepton) wird nach Abkühlung auf 50° mit 20 ccm sterilen defibrinierten Hammelblutes, 10 ccm Ascitesflüssigkeit, 4 ccm Maltosebouillon (1 g Maltose, 3 ccm Bouillon) gemischt.

Gonokokken.

Menschenblutserum nach Bumm (siehe oben).

Menschenblutserumagar nach Wertheim[427a u. b]: 1 ccm flüssiges Menschenblutserum wird mit dem Inhalt eines Agarröhrchens gemischt.

Ascitesagar nach Kiefer[201a]: Mischung von neutralem Fleischwasser-Glyzerinagar (3,5 Proz. Agar, 5 Proz. Pepton, 2 Proz. Glyzerin, 0,5 Proz. NaCl) mit gleichen Teilen Ascitesflüssigkeit.

Abel bestreicht gewöhnlichen Agar mit wenig aus einer desinfizierten Fingerkuppe gewonnenem Blut.

Nährboden nach Cantani (S. 406) und nach Wassermann (S. 407).

Vannod[413 u. 414] empfiehlt die folgende Modifikation des Wassermannschen Schweineserumagars: Anstatt 30—35 ccm Wasser mit 15 ccm Serum zu vermischen, verdünnt Vannod 15 ccm Serum mit 40 bis 50 Teilen Wasser. Zur Mischung werden nach Umschütteln 3 ccm Glyzerin und 1 ccm Nutrose gegeben, und dann kocht man das Ganze auf.

Nährboden nach Piorkowski[318]: 1 l frische Milch wird mit 5 ccm verdünnter Salzsäure 1 : 4 versetzt, bei 37° bis zur Ausfällung des Kaseins aufbewahrt, filtrieren, mit 10 Proz. Sodalösung neutralisieren; 2 Stunden im Dampftopf kochen, neutralisieren, filtrieren, 1 Stunde bei 100° sterilisieren. Die Mischung wird mit gleichen Teilen oder 2 Teilen 3-proz. Nähragars vermischt.

Lipschütz[244] stellt in folgender Weise einen einfachen Gonokokkennährboden her: In einem größeren Glaskolben wird eine 2-proz. Lösung von Eiereiweiß in Leitungswasser bereitet und mit 20 ccm einer $^1/_{10}$ Normallauge pro 100,0 der Lösung versetzt, eine halbe Stunde stehen gelassen und während dieser Zeit öfters umgeschüttelt, hierauf im Erlenmeyerschen Kölbchen in Mengen von 30—50 ccm filtriert und sterilisiert: Die Reaktion ist mit empfindlichem Lackmuspapier deutlich alkalisch. Diese Eiereiweißlösung wird dem verflüs-

sigten und wieder abgekühlten Agar oder gewöhnlicher Bouillon im Verhältnis von 1:2 oder 3 zugesetzt.

Bruschettini und Ansaldo[42 u. 43] setzen zu 10 ccm Glyzerinbouillon 1 Tropfen defibrinierten Blutes oder 1 Tropfen frischen Hühnereiweißes oder Eigelb.

Nakao Abe[2] verwendet an Stelle von Ascites und Serum Rindfleischwasserfiltrat.

K. Thalmann[402] benutzt zur Züchtung der Gonokokken gewöhnlichen Fleischwasseragar und Bouillon, der er etwa $^2/_3$ bis $^3/_4$ der zur Phenolphthalein-Neutralisierung notwendigen Natronlösung zusetzt. Vannod, Brongersma und van de Velde[38] hatten gleichfalls gute Resultate.

Vannod[213 u. 214] empfiehlt als flüssigen Nährboden: 1 Teil einer auf den vierten Teil eingekochten, nicht peptonisierten Kalbsbouillon, gemischt mit 3 Teilen Ascites.

Rothe[344] benutzt zur Differenzierung der Gonokokken und Meningokokken verschiedene Zuckernährböden: Gonokokken vergären nur Dextrose, Meningokokken auch Maltose.

Keuchhustenbacillus.

Nährboden nach Bordet und Gengou[32, 212, 378]: Zu 200 ccm 4-proz. Glyzerinwassers werden 100 g zerschnittene Kartoffeln hinzugefügt, $^1/_4$ Stunde im Autoklaven bei 115° gelassen und durch Leinwand oder Glaswatte filtriert, 50 ccm dieser Mischung werden mit 150 ccm 0,6-proz. Kochsalzlösung und 5 g Agar versetzt. Der fertige Agar wird zu je 2—3 ccm auf Reagenzgläser verteilt und sterilisiert; zu dem auf 60° abgekühlten Nährboden wird die gleiche Menge defibriniertes steriles Menschen-, Kaninchen- oder Hundeblut gemischt.

Streptokokken.

Zur Differenzierung von Streptokokken verwenden Gordon[139], Salomon u. a. Kohlehydratagar.

Salomon[351] löst zu diesem Zweck 10 Proz. Kohlehydrate in Lackmustinktur, von welcher dann 1,5 ccm mit 10 ccm 3-proz. Nähragars gemischt werden; zu der 58° warmen Mischung kommen noch 5 ccm gleichwarmer Ascitesflüssigkeit, so daß schließlich stets 1-proz. Kohlehydratlösungen vorliegen. Das schwer lösliche Dulcit wird in Substanz, Inulin und Amylum solubile als Emulsion zugefügt.

Schottmüller[365], Loening[251], Boxer[35] benutzen den Blutagar zur Differenzierung. (Ueber die Bestimmung der Virulenz mit Hilfe von Blutagar vgl. Kap. 6.)

Pneumokokken.

Wiens[429 u. 430] reichert die Pneumokokken in 10-proz. leicht alkalischen Peptonwasser an, das 1 Proz. Dextrose enthält. Auf 10 ccm der Flüssigkeit kommt 1 ccm Blut, nach 24—48-stündigem Bebrüten wird das Sediment auf Agarplatten ausgegossen.

Elschnig[87 u. 88] hat das von Römer empfohlene Anreicherungsverfahren mit Serumbouillon in der Weise modifiziert, daß er Pferdeserum im Vakuum eintrocknen und in Ampullen einschmelzen ließ. Zum Gebrauch wird gewöhnliche Bouillon mit dem Serum gemischt.

Sehr üppiges Wachstum erzielt man auch durch Zusatz steriler Kreide zur Nährbouillon, die die entstehende Säure abstumpft.

Züchtung der Spirochäten, speziell der Spirochaete pallida.

Schereschewski[357–360], Mühlens[275], Hoffmann u. a. züchteten auf autolysiertem Pferdeserum.

Volpino & Fontana[418] erzielten dadurch eine reichliche Vermehrung der Spirochäten in kranken Gewebsstücken, daß sie kleine Stücke von feuchten Papeln oder von Primäraffekten lebender Individuen ausschnitten und bei 37° in verschiedene Flüssigkeiten brachten: Steriles menschliches Blut; dasselbe mit Zusatz von Natroncitratlösung; Blutserum; Ascites-Flüssigkeit; diese mit 20-proz. Fischleim versetzt; durch Kochen von Kalbsfüßen enthaltene Gelatine; mit Traubenzucker versetzte Kalbsgelatine.

Reinzüchtung der Spirochaete pallida nach Noguchi[287]. Kaninchenserumwasser (1 Teil Serum, 3 Teile Wasser) mit Zusatz von Stückchen frischer Niere oder Hoden von Kaninchen wird mit 3 cm hoher Schicht von sterilem flüssigen Paraffinöl überschichtet. Die Kultur findet anaërob statt und darf 2 Wochen nicht unterbrochen werden.

Konservierung der Nährböden.

Um beim Aufbewahren der fertigen Nährböden in Kolben eine Wasserverdunstung aus den Nährböden zu verhüten, hat Burri einen von Stutzer[396] konstruierten Gummiverschluß beschrieben. Er besteht aus einer Gummikappe mit einem ventilartig wirkenden engen Schlitz. Man bringt diesen Gummiverschluß vor dem Sterilisieren auf das Reagenzglas oder den Kolben. Beim Sterilisieren öffnet sich nun infolge der Luftausdehnung das Ventil und läßt den Wasserdampf entweichen. Beim Erkalten entsteht durch Verdichten des Wasserdampfes in der Flasche ein Vakuum und die atmosphärische Luft drückt den Verschluß fest auf den Flaschenhals, so daß das Ventil luftdicht geschlossen ist.

Löffler füllt die fertigen Nährböden in Flaschen mit engem Hals, die mit einem Verschluß versehen sind, der dem bei Bierflaschen gebräuchlichen entspricht.

Der Verschluß der Kulturröhrchen geschieht in der Regel durch Wattepfropfen; speziell für Tuberkelbacillenkulturen auf Glyzerinkartoffel wird nach Flügge ein helmartiger Verschluß verwendet, der dem geschliffenen oberen Rande des Kulturröhrchens aufgesetzt wird und einen dauernden Luftzutritt durch die kleine mit Wattepfröpfchen versehene Oeffnung des hohlen helmspitzenartigen Endes gestattet.

Um Kulturröhrchen längere Zeit vor dem Eintrocknen zu schützen, benutzt Glage[136] zum Verschluß sogenanntes „fusible Metall“ (zu beziehen von Krauth, Hamburg). Diese Masse wird wie Siegellack mittels der Flamme des Bunsenbrenners geschmolzen, und die abschmelzenden Tropfen werden aus einer Höhe von $^1/_4$—$^1/_2$ m auf eine Glasplatte fallen gelassen, wo sich jeder Tropfen unter Erstarren in eine etwa markgroße Metallscheibe verwandelt. Nachdem man den Wattepfropf in das Reagenzglas etwas hineingeschoben hat, werden diese Scheiben auf die Oeffnung des Reagenzglases aufgelegt.

Der die Glaswand überragende Rand der Metallscheibe wird zum leichten Schmelzen gebracht, wobei er sich allseitig genau an die Wand des Glases anlegt, darauf schnell erstarrt und damit einen vollständigen Verschluß bildet. Zum Oeffnen des Glases genügt es, einfach die Metallkappe kräftig umzudrehen. Der Schutz vor dem Eintrocknen mittels dieses Verschlusses währt mehrere Monate.

Chatterjee [59] ersetzt die Wattepfröpfe durch ein zweites weiteres, über das erste gestülpte Reagenzglas, ein Verschluß, der sich besonders für das heiße Klima eignet und eine Verunreinigung der Kultur von außen verhindert.

Caulfeild [57] läßt den Hals von Flaschen für die Nährsubstrate etwas einschnüren und bewirkt den Abschluß durch eine hier aufgelegte Glaskugel, ein Wattebausch verschließt das Ganze.

Bei Petrischalen wird nach Reiner-Müller das Paraffin oder eine Mischung gleicher Teile weißen Wachses und wasserfreien Lanolins in den Zwischenraum der Schalen, in dem man vorher eine Schnur mit herausragenden Enden gelegt hat, eingegossen.

Methoden der Verwendung der Nährböden zur Isolierung und Züchtung der Bakterien.

Die im vorhergehenden in ihrer Bereitung geschilderten Nährböden werden nun zur Isolierung und Züchtung der Keime benutzt. Dieselbe gelingt, wie später gezeigt werden soll, sicher und relativ einfach bei Verwendung der von Koch (1881) eingeführten festen, durchsichtigen Nährböden (Gelatine und Agar). Ursprünglich aber, solange man auf flüssige Nährböden angewiesen, waren die Methoden der Isolierung außerordentlich zeitraubend und mühsam.

I. Methoden der Reinzüchtung auf flüssigen Nährböden.

a) Massenkultur.

Die ersten Reinkulturen von Mikroorganismen wurden von Pasteur [298 u. 299] (1857) und Cohn [61] erzielt. Als Ausgangsmaterial dienten „Massenkulturen“. In bakterienhaltigen Flüssigkeiten sind bei dem Antagonismus verschiedener Arten einzelne Species im Kampf ums Dasein überlegen. Diese werden schließlich die Oberhand über andere gewinnen, und wenn man dann Spuren der Ausgangsflüssigkeit in eine neue Nährflüssigkeit überträgt, so besteht die Wahrscheinlichkeit, zumal wenn hier die ursprünglichen Lebensbedingungen vorliegen, eine Reinkultur zu bekommen.

Klebs [210] (Methode der fraktionierten Kultur) nahm eine Spur des Materials aus einer bakterienhaltigen Flüssigkeit mittels einer Kapillare, brachte das Material in sterile Nährlösung und wiederholte diesen Prozeß mehrere Male, bis er eventuell diejenigen Bakterien rein erhielt, die in der Ursprungsflüssigkeit in überwiegender Menge vorhanden waren.

Auf diese Weise kann man wohl zur Züchtung einer einzelnen Art kommen, aber es ist nicht gesagt, daß diese die ursprünglich für die Reinzüchtung bestimmte war; und es ist schwer, bei nachträglicher Verunreinigung wieder die ursprüngliche Art rein zu erhalten.

Leichter gelingt die Isolierung sporenhaltiger Bakterien, die zuerst Roberts [333] erreicht hat. Da Sporen im Gegensatz zu den vegetativen

Formen hohe Hitze gerade vertragen, so kann man sie durch die Erhitzungsmethode wohl von diesen trennen, aber sobald im Ausgangsmaterial ein Gemisch von verschiedenen, sporenhaltigen Bakterien enthalten ist, läßt die Methode schon wieder im Stich.

b) Die Reinkultur von einem Keim aus. (Verdünnungsmethode.)

Brefeld[37] und in gleicher Weise Klebs gelang es dann, Reinkulturen, von einem einzigen Keim ausgehend, zu erzielen. Brefeld mischte das schimmelpilzhaltige Ausgangsmaterial so stark mit Wasser oder Nährflüssigkeit, bis in einem auf den Objektträger gebrachten Tröpfchen sich nur noch ein oder zwei Keime befanden. Dazu setzte er einen Tropfen Nährlösung, schützte den Kulturtropfen durch Anwendung hohlgeschliffener Objektträger vor der Verdunstung oder gab geringe Menge Gelatine zu, wodurch gleichfalls eine weitere Entwickelung des eingebrachten Keims gewährleistet wurde.

Die Reinzüchtung von Bakterien auf Grund des Brefeldschen Prinzips der Verdünnung gelang zuerst Lister[245]. Er verdünnte soweit, daß ein oder zwei Tropfen der Verdünnung noch gerade einen Keim enthielten. Mit diesen Mengen impfte er sterile Nährlösungen und hatte so die Möglichkeit, in einer Reihe von Fällen nur einen Keim zu übertragen oder unter mehreren auch einmal Keime einer Art und so Reinkulturen zu erzielen. Aber eine Sicherheit, daß nicht mehrere verschiedenartige Keime verimpft wurden, bestand nicht. Die Schwierigkeit steigerte sich natürlich, je mehr Arten in einem Gemisch vorhanden waren, und wuchs ins Unendliche, wenn es galt, alle Arten eines Gemisches zu isolieren.

Ein dem hohlgeschliffenen Objektträger ähnlicher Apparat, der es gestattet, aus dem hängenden Tropfen einen einzigen Keim herauszunehmen und von diesem ausgehend eine Reinkultur zu gewinnen, ist von Schouten[366 u. 367] angegeben. Man bringt das starkverdünnte, bakterienhaltige Material auf ein Deckgläschen und in die Nähe einen Tropfen einer Nährlösung. Das Deckgläschen wird umgekehrt über eine feuchte Kammer gestülpt, in die von außen verschiebbar zwei sehr feine Glasnadeln hineinragen. Man kann unter Kontrolle des Mikroskops mit der einen Glasnadel einen Keim aus dem Tropfen herausfischen und ihn mit Hilfe der anderen Nadel in den Nährmaterialtropfen überführen.

Das Burrische Tuscheverfahren s. S. 131.

c) Kultur in Kapillaren.

Den Uebergang zur Reinzüchtung auf festen Nährsubstraten bildet die Kultur in Kapillaren von Salomonsen[352 u. 353]. Im bakterienhaltigen Blut entwickeln sich außerhalb des Körpers die verschiedenen Keime an verschiedenen Stellen und eine Vermischung findet wegen der Dickflüssigkeit des Blutes und der schnellen Gerinnung nicht statt. Diese Beobachtung führte Salomonsen zu der Methode der Züchtung in Kapillaren. Er fing das bakterienhaltige Blut in sterilen Kapillarröhren auf und sah an verschiedenen Stellen Kolonien sich entwickeln, die bei verschiedenen Arten entsprechende Differenzen in der Form usw. erkennen ließen. Nach Oeffnung des Röhrchens an der Stelle einer bestimmten Kolonie kann man mit steriler Nadel diese

abimpfen und das Material in steriler Flüssigkeit als Reinkultur weiterzüchten.

2. Methoden der Züchtung und Isolierung der Bakterien auf festen Nährböden.

Während in Flüssigkeiten stets eine Vermischung differenter Keime stattfinden muß, werden auf einem festen Nährmedium verschiedene an verschiedene Stellen gelangte Keime an diesen Orten getrennt und isoliert zur Entwicklung kommen. Dies Prinzip benutzte R. Koch (1881) zur Reinzüchtung und Isolierung der Bakterien vermittelst fester Nährböden. Da er dazu durchsichtige Nährböden verwandte, so schuf er noch die Möglichkeit, mikroskopisch die Wachstumseigentümlichkeiten der einzelnen Kolonien zu studieren; damit war auch die Differentialdiagnose von Arten, deren Einzelindividuen morphologisch sich gleich verhalten, erleichtert. Da bei der Verwendung fester Nährböden etwa aus der Luft eindringende Keime nur lokalisiert am Ort ihres Haftens auf der Nährfläche sich vermehren können, so kann die Gefahr der Verunreinigung durch sie weniger in Betracht kommen.

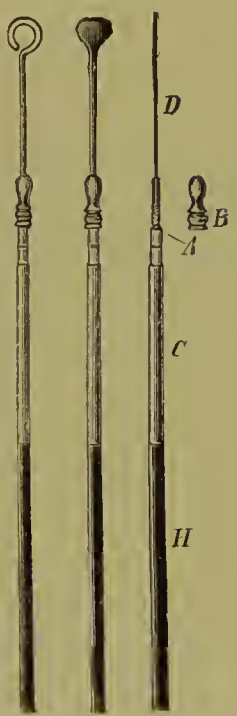


Fig. 56.

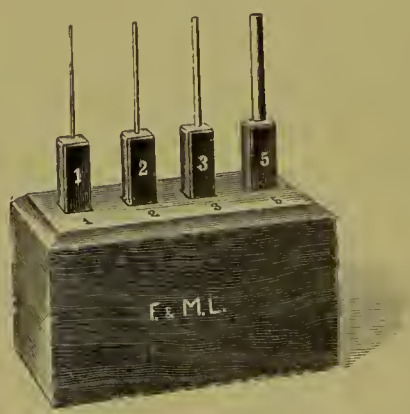


Fig. 57.

Zum Impfen benutzt man mit dem betreffenden Material infizierte Platindrähte, die eventuell an der Spitze zu einer Oese umgebogen und in Glasstäben eingeschmolzen oder in besondere von Kolle angegebene Halter (Fig. 56) eingeschraubt sind. Um zu vergleichenden Untersuchungen immer Oesen von konstantem Durchmesser herstellen zu können, hat Czaplewski einen Satz von Oesenmaßstäben verschiedener Dicke konstruiert (Fig. 57). Forster verwendet spiralenförmig gebogene Platindrähte, die besonders zur gleichmäßigen Abmessung von kleinen Flüssigkeitsmengen dienen.

a) Methode der Objektträgerkultur.

Ursprünglich verfuhr Koch so, daß er verflüssigte Gelatine auf Objektträgern ausgoß, den Nährboden hier bis zur Zähflüssigkeit erstarren ließ und dann mit einer sterilisierten Platinnadel eine Spur

des Impfmaterials in Strichen über die ganze Gelatinefläche verteilte. Es blieb dann von Strich zu Strich weniger Material hängen, und die in den letzten Strichen liegenbleibenden Keime kamen schließlich vereinzelt an getrennten Stellen nach dem Erstarren der Gelatine zur Entwicklung, ohne sich mit benachbarten vermischen zu können. Um ein Austrocknen der Gelatine und die Luftinfektion zu vermeiden, werden die geimpften Objektträger in feuchte Kammern, wie sie bei den Kartoffelkulturen beschrieben sind, eingelegt.

b) Das Plattenverfahren (nach Koch).

Um die Keime in der Gelatine noch besser zu verteilen, ging dann Koch zum Verfahren der Plattenkulturen über (1883).

Man bedarf für diese Methode Glasplatten von Objektträgerdicke, deren Breite und Länge man mit Rücksicht auf die Größe und Breite des Objekttisches so bemißt, daß alle ihre Punkte unter dem Mikroskop betrachtet werden können. Um die Gelatine auf die Platte in gleichmäßiger Schicht auszugießen, benutzt man einen besonderen Nivellierungsapparat (Fig. 58). Derselbe besteht aus einem mit Stellschrauben versehenen Holzdreieck, auf das eine offene Schale gestellt wird. In diese kommt eine kleinere, mit Wasser und Eisstücken gefüllte Schale, die von einer matten Glasplatte überdeckt ist, auf Korkfüßen zu stehen. Diese Scheibe wird durch eine Dosenlibelle horizontal eingestellt. Auf die Glasplatte kommen die mit Gelatine zu beschickenden Platten. Zum Schutz vor Luftverunreinigung kann eine Glasglocke übergestülpt werden.

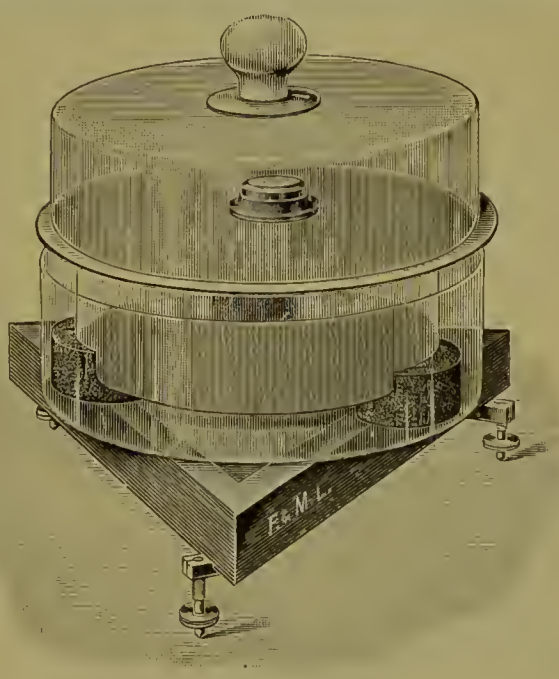


Fig. 58.

Die Verwendung von Eis ist überflüssig bei einem von M. Neisser angegebenen sehr zweckmäßigen Verfahren. Hier werden die Platten direkt auf eine genau horizontale Kühlschlange von Bleirohr gelegt, die mit Wasserleitung und Ausgußbecken verbunden ist.

Der Nivellierungsapparat von Serkowski[377] besteht aus einer 3- oder 4-eckigen dicken Glasplatte, die auf Schraubenfüßen befestigt ist und auch als Basis für das Mikroskop dienen kann.

Die wichtigsten Glasgefäße zur Züchtung sind Reagenzgläser, Petrischalen, kleine, weitbauchige Kolben nach Erlenmeyer, Schalen zu Massenkulturen nach Kolle (Fig. 59) und Friedberger-Reiter[115] (Fig. 60). Letztere bestehen aus quadratischen Weißblechschalen von 25 cm Seitenlänge und 1 cm Höhe. Ein überhängender, ebenfalls aus Weißblech gefertigter Deckel, an dessen Innenseite mittels eines

Drahtgestells Fließpapier zum Aufsaugen der Feuchtigkeit angebracht werden kann, wird über die Schale gedeckt. Die Aussaat auf solche Schalen geschieht entweder mit einem Glasspatel oder mittels einer

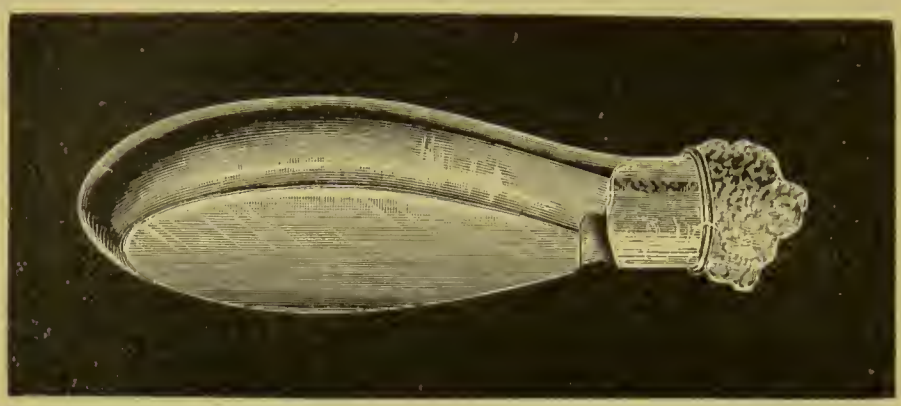


Fig. 59.

sterilen Glaspipette. Sehr zu empfehlen sind die für diese und ähnliche Zwecke angegebenen Saugpipetten von Max Wolff[452], Permin[306] (käuflich bei Altmann-Berlin) und von Kitt[209] (käuflich bei Lautenschläger-Berlin), bei der letzteren geschieht das Aufsaugen durch Eindrücken der an dem becherförmig erweiterten oberen Ende der Pipette aufgespannten Gummimembran (auch zum Umstechen und Umzüchten anaërober Bakterien geeignet).

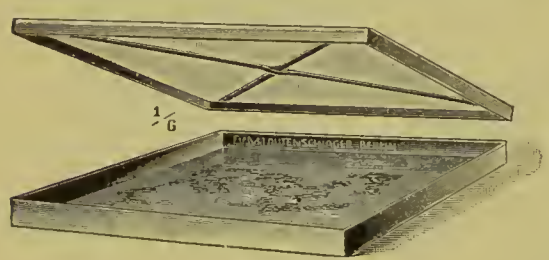


Fig. 60.

Beim Plattenverfahren wird die verflüssigte Gelatine bereits vor dem Ausgießen infiziert, wodurch die Keime auf eine größere Menge Gelatine verteilt werden. In dieser Methode der Impfung in verflüssigte Gelatine vereinigte Koch in genialer Weise die Vorzüge des Pasteurschen Verdünnungsprinzips mit dem Prinzip der festen Nährböden. Das Verfahren gestaltet sich folgendermaßen: Es wird ein Röhrchen mit verflüssigter Gelatine mittels ausgeglühter Platinnadel mit einer Spur des zu untersuchenden Materials beimpft. Ist es eine Flüssigkeit, so wird je nach dem Keimgehalt eine bis mehrere Oesen in die flüssige Gelatine übertragen. Festes Material wird mit einem Platinspatel an den Innenwänden des Reagenzglases verrieben und dann in der Gelatine gleichmäßig verteilt oder vorher in einer Reibschale mit steriler Kochsalzlösung zerquetscht und ösenweise übertragen. Beim Impfen wird das Reagenzglas zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand so eingeklemmt, daß das offene Ende auf Ring- und kleinem Finger ruht. Durch drehende Bewegung wird der Wattepfropf mit Zeigefinger und Mittelfinger der anderen Hand von deren Rückenfläche aus herausgezogen. Bei der Impfung wird die Platinöse schreibfederartig in der rechten Hand gehalten. Man hat darauf zu achten, daß der Inhalt der Oese gänzlich in die Gelatine hineingelangt; die aus dem Röhrchen zurückgezogene Oese muß leer sein. Nach erfolgter Infektion wird der Wattepfropf wieder

aufgesetzt, und das Material durch Drehen, Senken und Heben des Röhrchens gleichmäßig verteilt.

Ist das Ausgangsmaterial einigermaßen bakterienreich, so genügt die im Gelatineröhrchen erzielte Verdünnung nicht, um später isolierte Kolonien zu erhalten. Man überträgt dann, indem man ein zweites Röhrchen mit verflüssigter Gelatine in der gleichen Weise wie das erste und parallel mit diesem hält, mit ausgeglühter Platinöse eine geringe Menge des Inhalts des ersten Röhrchens in das zweite, eventulle impft man noch aus dem zweiten in ein drittes und aus diesem in ein viertes (Röhrchen α, β, γ). Auf diese Weise erzielt man von Röhrchen zu Röhrchen eine Abnahme der Keimzahl. Der Inhalt der infizierten Röhrchen wird nun auf die vorher auf den Nivellierungsapparat gelegten Platten so ausgegossen, daß er allseitig noch um etwa 1 cm vom Rand entfernt bleibt. Die geimpften Platten werden in einer feuchten Kammer auf Glasbänken übereinander aufgestellt. Die beim schnellen Erstarren der Gelatine an verschiedenen Stellen liegengebliebenen Keime wachsen später zu isolierten Kolonien aus.

Bei der Verdünnung in der Gelatine findet eine so ausgedehnte Keimtrennung wie in Flüssigkeiten nicht statt, was ja bei der zähen Konsistenz des Mediums ohne weiteres verständlich ist. Da, wo es sich um genaue quantitative Bestimmung der Keimzahl handelt, nimmt man deshalb besser nach Hueppe die ersten Verdünnungen in Flüssigkeiten vor.

c) Modifikationen des Plattenverfahrens.

α) Ersatz der Platten durch Petrische Schalen.

Das Kochsche Plattenverfahren wird in der ursprünglichen Form heute zumeist nicht mehr geübt, ist jedoch im Prinzip das gleiche geblieben; man hat nur die Platten durch bequemere Doppelschalen ersetzt, bei denen ein Abfließen der Gelatine vermieden wird, wodurch das Arbeiten mit dem umständlichen Nivellierungsapparat und die Benutzung der feuchten Kammer sich erübrigt. Die Doppelschalen (Fig. 61) sind ursprünglich von Salomonsen (l. c.), später von Babes[5 u. 6] und Petri[309] empfohlen worden und gehen allgemein unter dem Namen der Petrischen Schalen. Petri stellt sie auch aus dunklem Glas her und versieht sie am Boden mit einer Rille, die das Aufeinanderstellen vieler Schalen erlaubt, ohne daß die oberen abgleiten.

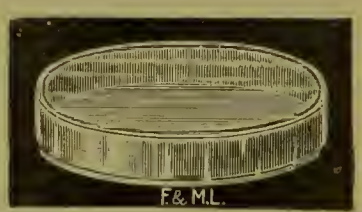


Fig. 61.

M. Beck[12] hat eine Kulturschale angegeben, bei der der Deckelrand einen ringförmigen Falz besitzt, der in die Unterschale hineinpaßt. Kehrt man den Deckel um und setzt die Unterschale von oben ein, so kann man den zwischen beiden Hälften befindlichen Wall durch Wasser oder Paraffin absperren und dadurch eine Verdunstung im Innern der Schale verhüten. Durch seitlich in den Deckel eingeschmolzene Glasröhren kann eine Durchleitung von Gas erfolgen, was die Benutzung dieser Schalen zur Anaërobenzüchtung ermöglicht.

β) Methode der „Rollröhrchen“ (v. Esmarch).

Die Benutzung von Platten oder Schalen fällt ganz weg bei einer Modifikation des Plattenverfahrens von v. Esmarch. Bei diesem

Verfahren der „Rollröhrchenkultur“ wird das in der gewöhnlichen Weise infizierte Gelatineröhrchen mit einem über den Wattepfropf gesteckten Gummipfropfen fest abgeschlossen. Darauf wird die Gelatine in dünner Schicht längs den Innenwänden des Reagenzglases zum Erstarren gebracht, indem man dies in eine Schale mit Eiswasser fast horizontal einlegt und um die Längsachse rollt.

Prausnitz konstruierte zum Ausrollen einen besonderen Rotationsapparat. Andere sind von Körber [220] und Nuttal [291] angegeben. Schill [361] verteilte die Gelatine längs den Wänden des Glases in der Weise, daß er in die verflüssigte und geimpfte Gelatine ein zweites engeres, steriles Reagenzglas so hineinschob, daß der Nährboden sich zwischen beiden ausbreiten mußte.

γ) Methode von Soyka [384].

Andere Modifikationen des Plattenverfahrens bezwecken eine Ersparnis an Gelatine und Platten. Bei dem Soykaschen Verfahren wird die flüssige Gelatine in mehrere auf dem Boden einer Doppelschale befindliche Ausschliffe eingegossen, die nacheinander von einem ausgehend infiziert werden. Man kann nach Heim auch eine einfache Glasplatte ohne Ausschliffe benutzen.

δ) Methode der Agarplatten.

Bei der Verwendung des Agars benutzt man fast ausschließlich Petrischalen, da der Agar auf den randlosen Glasplatten nur sehr schlecht haftet (v. Esmarch suchte dieses durch Zusatz von Gummi arabicum zum Agar zu vermeiden). Da der Agar ferner sehr leicht erstarrt, so erfordert das für die Gelatine beschriebene Verfahren viel größere Schnelligkeit des Arbeitens und ein zu frühzeitiges Wiedererstarren des Agars ist häufig nicht zu vermeiden. In der Regel begnügt man sich daher bei der Verwendung von Agar mit einer oberflächlichen Aussaat nach dem Prinzip der alten Kochschen Objektträgerkulturen. Der in Schalen ausgegossene Agar wird erst nach dem Erstarren oberflächlich infiziert. Das zu impfende Material, von dem bei hohem Bakteriengehalt eventuell vorher noch Verdünnungen in steriler Bouillon angelegt werden müssen, wird zu dem Zweck mit einer Platinöse oder einem vorher sterilisierten und infizierten kleinen Platindrahtpinsel (Kruse [224]) über die ganze Oberfläche der Platte gestrichen. M. Neisser [281] infiziert ein steriles Wattebäuschchen mit dem auszusäenden Material und streicht damit einmal über die Platte. An dem Ausstrich wird ein zweites Wattebäuschchen infiziert und damit ein Impfstrich parallel dem ersten angelegt, dieser dient wieder als Impfmaterial für ein drittes Wattebäuschchen und so fort über die ganze Platte.

Ferner ist von M. Neisser ein Plattenausstrichapparat angegeben worden (Fig. 62). Er besteht aus einem runden Nickeltisch, der auf einer Säule montiert ist. Mittels Handbewegung läßt sich der Tisch in rasche Rotation versetzen. Auf der Platte des Tisches kann eine Agarschale eingeklemmt werden. Das Ausstreichen erfolgt zweckmäßiger statt mit einer Platinöse mit dem kurzen Ende eines rechtwinklig gebogenen Glasspatels (Drigalskispatel) oder mit der Kuppe seine von außen sterilisierten Reagenzglases.

Die erwähnten Verfahren bieten den Vorteil, daß man ausschließlich leicht abimpfbare Oberflächenkolonien erhält. Will man jedoch auch Tiefenwachstum von Kolonien beobachten, so übergießt man einen Teil der geimpften Agarfläche mit einer zweiten Schicht sterilen Agars.

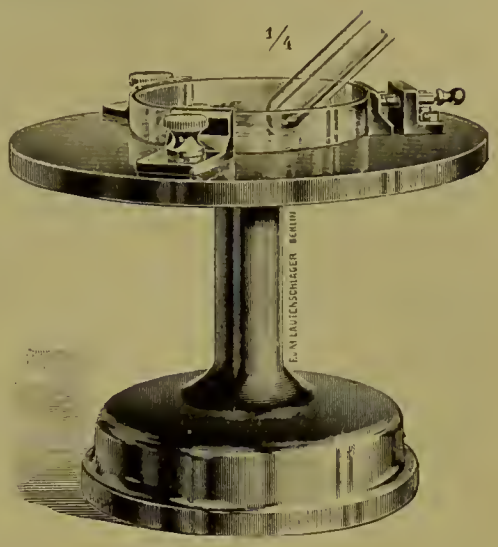


Fig. 62.

ε) Modifikation des Plattenverfahrens für flüssige Nährböden.

Für die Keimtrennung in flüssigen Nährmedien nach dem Prinzip der Plattenmethode ist eine Methode von DROSSBACH[85] ausgearbeitet. Sterile Glasplatten, die mit gepreßten oder geschliffenen Vertiefungen von 2—3 mm Tiefe versehen sind, werden mit einer Aufschwemmung der bakterienhaltigen Substanz in Bouillon übergossen. Das Impfmaterial ist so verdünnt, daß 2—3 ccm weniger als 1000 lebensfähige Keime enthalten. Mit ungeleimtem, sterilisiertem Papier wird der Ueberschuß der Flüssigkeit von der Platte entfernt, so daß erstere nur in den Vertiefungen zurückbleibt. Die Bebrütung der Platten erfolgt in feuchten Kammern. Ist in einer Vertiefung nur ein Keim vorhanden, so wird wie hier eine Reinkultur entstehen. Ein ähnliches Verfahren hat HOLTEN[179] beschrieben. Er hat außerdem eine mit einer Anzahl von Stiften versehene sterile Platte nach erfolgtem Wachstum so auf die Kulturplatte gebracht, daß die Stifte in die einzelnen Bouillontropfen hineinragten. Mit Hilfe dieser infizierten Stifte impfte er dann eine Gelatineplatte. Die Glasplatten kann man durch Petrischalen ersetzen, die mit erstarrtem Paraffin ausgefüllt sind, in das Vertiefungen mit Hilfe eines Korkbohrers eingelassen sind.

d) Das Burrische Tuscheverfahren zur Gewinnung von Einzellenkulturen.

(Vgl. auch Kap. 2.)

Die Nachteile des Plattenverfahrens und der fraktionierten Aussaat besteht in der Unsicherheit, ob die erhaltenen Kolonien aus einzelnen Individuen sich gebildet haben oder ob sie aus mehreren entstanden sind. Eine zuverlässige Züchtung aus einer Bakterienzelle ist nur mittels des BURRISchen Tuscheverfahrens möglich. Es gestaltet sich verschieden je nachdem Bakterien auf Gelatinenährböden gedeihen oder höhere Temperaturen (37 °) beanspruchen.

a) Anwendung für Bakterienarten, die auf Gelatineplatten (bei höchstens 22° C) wachsen. Als Gelatinenährboden wird eine 10-proz. Fleischwasser-Peptongelatine oder Molkengelatine verwendet. Auch Zusätze für bestimmte Bakterien sind selbstverständlich möglich. Die Tuscheverdünnung wird von einem durch Dr. GRÜBLER & Co. in Leipzig zu beziehenden Präparat (Pelikan-

tusche 541) in der Verdünnung 1:9 Teilen dest. Wasser hergestellt. Nach gründlicher Mischung wird die schwarze Flüssigkeit zu je 10 ccm in möglichst saubere Reagenzgläser abgefüllt und unter Watteverschluß im Autoklaven $^1/_2$ Stunde lang bei $^1/_2$ Atmosphäre sterilisiert. Vor dem Gebrauch läßt man die Gläschen mindestens 2 Wochen stehen und verwendet dann nur die oberen Schichten der Flüssigkeit.

Mit Hilfe einer großen Platinöse entnimmt man nacheinander 4 große Tuschetropfen und setzt sie nebeneinander auf einen absolut reinen und von Fett befreiten Objektträger. Sofort verreibt man eine geringe Menge des keimhaltigen Materials (bei Stichkulturen eine kaum sichtbare Nadelspitze, bei flüssigen Kulturen eine kleine Oese) in den ersten Tuschetropfen, überträgt mit einer kleinen Oese etwas Tusche aus dem ersten Tropfen in den zweiten, aus dem zweiten in den dritten, aus dem dritten in den vierten ohne die Oese zwischen den einzelnen Verdünnungen auszuglühen. Mit der unteren konkaven Seite einer vorsichtig in der Flamme (ohne auszuglühen) sterilisierten Tuschefeder werden aus den zwei letzten Verdünnungen Spuren entnommen und auf einer Gelatineplatte Punkte in regelmäßigen Reihen aufgetragen. Man berührt hierbei den Tropfen, aus dem das Material entnommen werden soll, mit der fast horizontal gehaltenen Feder und erzeugt die Punkte auf der Gelatine, indem man mit aufgestützter Hand schnell aber vorsichtig eine stechende Bewegung nach der Gelatinefläche ausführt ohne diese zu verletzen. Es empfiehlt sich, die Punkte in gleichmäßigen Reihen aufzutragen, wobei die Gesamtzahl sich nach der zu isolierenden Keimart zu richten hat. Verflüssigende Arten, deren Kolonien fädig auswachsen, lassen auf dem gleichen Flächenraum weniger Punkte zu. Nach dem Reinigen der Feder wird ein steriles Deckglas auf die Punkte aufgelegt (ungefähr nach $^1/_2$ Minute). Die Betrachtung der Tuschepunkte kann mit beliebig starken Vergrößerungen, selbst mit Immersionssystemen vorgenommen werden. Die Bakterien erscheinen hellleuchtend zwischen den schwarzen Tuschepartikeln. Hat man die Punkte in regelmäßigen Reihen angeordnet, so lassen sich leicht diejenigen, die nur eine Zelle enthalten, merken. Man braucht nur die Reihe und die Stellung des betreffenden Punktes innerhalb der Reihe zu notieren. Eine Kennzeichnung der Tuschepunkte, die nur eine Zelle enthalten, an der unteren Seite der Nährbodenschale mit gewöhnlicher Tinte, ist gleichfalls zweckmäßig. Man kann nun abwarten, bis die Vermehrung der Zelle soweit fortgeschritten ist, daß die Kolonie dem bloßen Auge sichtbar wird und abgeimpft werden kann. Man kann aber auch das Tuschescheibchen mikroskopisch überwachen: es ist bloß nötig, nachdem die Kolonie bis zu einer gewissen Zellenzahl gediehen ist; das Deckglas auf einem Objektträger zu montieren: da, wo früher die einzelne Zelle lag, findet sich jetzt eine ganze Gruppe. Mit dem Deckglas hat man nicht die ganze Kolonie disloziert, sondern ein großer Teil der neu gebildeten Zellen ist im Nährboden haften geblieben, und nach Ablauf einer gewissen Zeit sieht man dort eine Kolonie sichtbar werden, die als unzweifelhafte Einzellenkultur abgeimpft werden kann. Es ist unzweckmäßig, das Deckgläschen bei luftliebenden Bakterien länger liegen zu lassen, als bis 50—100 Zellen entstanden sind. Man entfernt es dann besser, so daß unter der Einwirkung des frei zutretenden Sauerstoffes ein üppigeres Wachstum der Kolonie eintritt und so eine frühere Abimpfung ermöglicht wird.

b) Anwendung für Bakterienarten, die auf Gelatineplatten nicht gedeihen. Es gehören hierher die Anaëroben, ferner die an höhere Temperaturen gewöhnten Arten, und solche, die nur in flüssigen Medien ihr Fortkommen finden. Bei der Isolierung der Keime wird hier nicht anders verfahren, als bei der Gruppe a. Die Entwickelung des Keimes verlangt aber die Berücksichtigung der besonderen Lebensansprüche. Ist die Einzellisolierung geglückt, so läßt die oben geschilderte Transportfähigkeit des Keimes zu, ihn in günstigere Lebensverhältnisse (Agarplatte, erhöhte Temperatur, anaërobe Bedingungen etc.) zu übertragen. Es ist zweckmäßig, die Tuschepunkte bei dieser Gruppe in verhältnismäßig weiten Abständen anzulegen, und jeden der Punkte mit einem sterilen Deckglassplitterchen von etwa 4 qmm zu bedecken. Die mikroskopische Betrachtung muß hier mit Trockensystem geschehen. Hat man die Tuschepunkte mit nur einer Zelle ausfindig gemacht, so bringt man mit einer sterilen Pinzette das Splitterchen in für die Auskeimung günstige Bedingungen (Anaëroben z. B. in verflüssigtem und abgekühltem Agar).

3. Die Züchtung von Bakterien in sauerstofffreier Atmosphäre.

Das Wachstum mancher Bakterienarten wird durch die Anwesenheit von Luftsauerstoff gehemmt (anaërobe Bakterien). Es ist deshalb der Sauerstoff sowohl aus dem Nährmedium wie aus dem umgebenden Raum auszutreiben. Die Befreiung des Nährmediums von Sauerstoff geschieht auf einfache Weise mittels Austreiben der Luft durch Kochen. Zweckmäßig benutzt man zur Anaërobenzüchtung Nährböden, die bereits mit reduzierenden Substanzen, Zucker, ameisensaures Natron, 0,3—0,5 Proz., indigschwefelsaures Natron, 0,1 Proz. (nach dem Vorgang von Kitasato & Weyl [208]) versetzt sind. Hammerl [147 u. 148] empfiehlt als reduzierendes Mittel das Schwefelammonium (Ammoniumsulfhydrat). Nach Trenckmann [404] gestattet der Zusatz von Schwefelalkali auch streng anaëroben Arten die Entwickelung bei Zutritt von Luft. (Zusatz von 4—10 Tropfen 10-proz. Na_2S-Lösung. in 10 ccm Bouillon, 2 Tropfen zu 20 ccm Agar.)

Umgekehrt hindert der Zusatz oxydierender Mittel nach Kitasato & Weyl (l. c.) das Wachstum der Anaëroben. 0,5 Proz. chlorsaures Kali, 0,05 Proz. chromsaures Natrium heben das Wachstum der Anaëroben auf, ohne aërobe Arten zu beeinträchtigen.

Um in Anaërobenkulturen das gebildete, eventuell schädlich auf das Wachstum der Kultur wirkende Gas zu entfernen, leitet es Epstein [91] durch ein Glasröhrchen, dem ein Bunsensches Lippenventil aufgesetzt ist, aus dem Kulturgefäß nach außen in einen dem Glasrohr dicht aufsitzenden mit 2-proz. Borsäurelösung gefüllten glockenförmigen Glastrichter.

Das Wachstum von Anaëroben kann ohne besondere Kautelen bisweilen in der Symbiose mit anderen Bakterien erfolgen, sei es, daß der Sauerstoff durch die anaëroben Arten vollständig verbraucht wird oder daß nach Kedrowsky [199] durch die Aëroben Stoffe gebildet werden, die ähnlich wie die reduzierenden Substanzen das Wachstum der Anaëroben auch bei Sauerstoffgegenwart gestatten. Nach den Untersuchungen von Scholtz [363] scheint die erste Annahme die richtige zu sein.

Der Ausschluß des Sauerstoffs von dem im Gefäß befindlichen Nährmedium wird auf verschiedene Weise erreicht.

(Zum Nachweis des vollständigen Sauerstoffmangels fügt man etwas konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung dem Nährboden zu oder bringt die Farblösung in ein Schälchen in den zur Züchtung benutzten Raum. Bei Sauerstoffabschluß entfärbt sich durch Reduktion das Methylenblau.)

a) Beschränkung des Luftzutritts.

R. Koch (l. c., 1884) erreichte sie dadurch, daß er über die geimpften Gelatineplatten Glimmer- oder Marienglasplatten legte. Das Glimmerblatt schmiegt sich vermöge seiner Elastizität vollständig an die Gelatineplatte an und hindert den Luftzutritt. Sanfelice [354] modifizierte dies Verfahren, indem er statt der Glimmerplatten eine Glasplatte auflegte, die darunter befindliche Luft herauspreßte und den Rand dieser Platte rings mit Gelatine umgoß.

Liefmann [242] hat das von Koch angegebene Glimmerplättchenverfahren wieder neu aufgenommen. Als Nährboden verwendet er dabei Traubenzuckeragar und überschichtet den Rand des Glimmerplättchens mit dem Nährboden.

Fehrs & Sachs-Müke [98] legen auf die frischbeimpfte Petri- und Drigalskischale sterile Glasplatten (alte photographische Platten); der Nährboden soll kurz vorher ausgekocht werden und darf nicht zu trocken sein.

Würger (Dissertation Erlangen, zit. nach Heim) gießt über die geimpfte Agaroberfläche eine Schicht ungeimpften Agars und legt, solange diese noch flüssig ist, das Liefmannsche sterilisierte Glimmerplättchen auf, dessen Durchmesser wenig kleiner ist als der der Kulturschale. Eine dritte mit Phenol versetzte Agarschicht wird oben aufgegossen.

Folgendes Herstellungsverfahren von anaëroben Plattenkulturen wird von Streng [394] angegeben: In eine Petrischale mit mindestens 2 cm hoher Kante eine Schicht flüssigen, mit Anaërobien infizierten Traubenzuckeragars gießen; möglichst schnell erstarren lassen, darüber sterilen Traubenzuckeragar füllen, darauf Glasdeckel umgekehrt mit umgebogener Kante drücken, bis die Deckelkante die Petrischale berührt. In die umgebogene Deckelkante nach Umstülpung der Schale flüssiges Paraffin (Schmelzpunkt 50 Grad) eingießen. (Zum Abimpfen der Kulturen braucht man bloß den Deckel durch drehende Bewegung abzunehmen, eventuell mit der Flamme vorher etwas erhitzen.)

Gaffky [130] und nach ihm W. & R. Hesse [166] und Liborius [240] verhinderten Luftzutritt durch Ueberschichtung des Nährmediums.

Gaffky brachte das Material ins Innere einer gekochten Kartoffel und verschloß die Zutrittsstelle wieder mit Kartoffelmasse. Hesse überschichtete mit Gelatine. Liborius endlich legte Stichkulturen in hochgeschichtetem Nährboden an und überschichtete hier die Einstichstelle mit Gelatine.

Aehnlich verfährt Mühlens [274, 275] bei der Züchtung von Spirochäten auf Pferdeserumagar und Noguchi [287] bei der Züchtung der Spirochaete pallida, wobei er noch eine Ueberschichtung mit flüssigem Paraffin vornimmt.

Es genügt jedoch auch, eine einfache Stichkultur in einer hohen Schicht des Nährmediums anzulegen, von dessen tieferen Partien die Luft auch ohne Abschluß genügend ferngehalten wird.

Le Dantec[73] kultiviert anaërobe Bakterien in Kapillaren, in welche er die geimpfte Bouillon aufsteigen läßt: Sauerstoff diffundiert in kapillaren Flüssigkeitsschichten nur langsam.

v. Esmarch[96 u. 97] erzielte Luftabschluß in seinen Rollröhrchen in der Weise, daß er den Innenraum des ausgerollten Röhrchens mit steriler Gelatine ausgoß. Um dabei ein Schmelzen des dünnen Gelatineüberzuges durch die erwärmte, verflüssigte Gelatine zu vermeiden, muß das Rollröhrchen während der Prozedur in ein Glas mit Eiswasser gestellt werden.

Die Kultur im frischen Hühnerei nach Hueppe gewährt gleichfalls Luftabschluß, vorausgesetzt, daß man die Schale des Eies vollständig mit Lack überzieht. Im nicht präparierten Ei besteht dagegen kein strenger Ausschluß der Luft, da durch die Schale stets geringe Mengen von Sauerstoff diffundieren.

b) Die Verdrängung der Luft.

Man kann die Luft entweder ganz austreiben und im Vakuum züchten oder die Luft durch das Nährmedium selbst oder durch ein indifferentes Gas verdrängen.

α) Austreibung der Luft und Züchtung im Vakuum.

Das Absaugen der Luft geschieht mit einer Luftpumpe (Fig. 63) oder Wasserstrahlpumpe (Fig. 64). Das einfachste Verfahren ist das von Gruber[141]. Er verengt lange Reagenzgläser im oberen Drittel

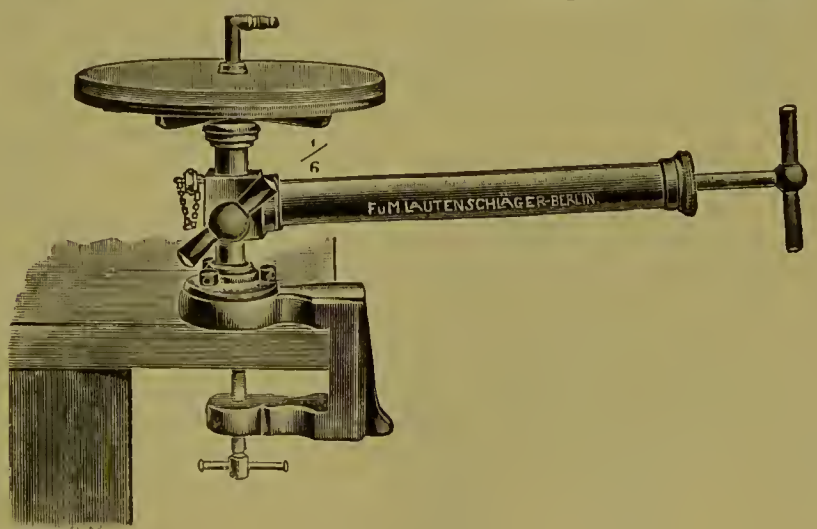


Fig. 63.

zu einem Hals (Fig. 65), nach dem Sterilisieren wird mittels eines Kapillartrichters die Nährlösung eingeführt, zu der man wegen der beim Evakuieren erfolgenden Eindickung auf 10 ccm noch 2 ccm sterilen destillierten Wassers hinzufügt. Nach Infektion wird der Wattepfropf bis zur Verengerungsstelle vorgeschoben und darüber ein Gummipfropf eingesetzt, der mittels eines durch seine Bohrung

gesteckten Rohres mit der Luftpumpe in Verbindung steht. Handelt es sich um Nährböden mit gelatinierenden Substanzen, so wird das Glas während der Evakuierung in ein Wasserbad gestellt, dessen Temperatur so gewählt ist, daß sich das Nährmedium flüssig erhält. Nachdem alle Luft ausgepumpt ist, wird die verengte Stelle abgeschmolzen. Bei gelatinierenden Nährmedien kann der Inhalt des Röhrchens alsdann ausgerollt werden. In der gleichen Weise wie in Röhrchen kann man die Evakuierung in flachen Gefäßen vornehmen und das gelatinierende Substrat am Boden des Gefäßes als Plattenkultur zum Erstarren bringen.

Fig. 64.

Zupnik[444] erzeugte das Vakuum zur Züchtung der Anaëroben auf folgende Weise: Er benutzte zylindrische Kulturgefäße, die an beiden Enden verjüngt und mittels Glashähnen luftdicht abschließbar sind. Nach Einfüllen der Nährlösung, Sterilisation und Impfung wird an das eine Ende des Gefäßes mittels eines Gummischlauches ein Glasrohr angefügt und dies mit Quecksilber gefüllt. Dann wird die Oeffnung des Rohres mit dem Finger zugehalten, der Apparat umgestülpt und unter Quecksilber gebracht. Nunmehr wird der untere Hahn geöffnet. Es entsteht nach dem Prinzip der Toricellischen Leere beim stattfindenden Ausfließen der Nährlösung ein absolutes Vakuum im Apparat. Ist ein gewisser Teil des Nährmediums ausgesogen, so wird der Hahn wieder geschlossen; die Entwickelung der verimpften Keime kann nunmehr unter anaëroben Verhältnissen erfolgen.

Fig. 65.

v. Hibler[173] verdrängt die Luft mittels Glashebers, er empfiehlt dabei für Anaëroben folgenden Nährboden: Hirn wird in der Hackemaschine zerkleinert, mit $^1/_3$—$^1/_4$ Raumteil Wasser oder 0,6-proz. Kochsalzlösung vermischt und $^1/_2$—1 Stunde gekocht, unmittelbar darauf in 5—10 cm hohe Reagenzröhrchen gefüllt.

β) Verdrängung der Luft durch das vorher ausgekochte Nährmedium.

Roux[345] saugt die ausgekochte Gelatine in das Mittelstück eines pipettenartigen Gefäßes, das nach der Impfung an beiden Enden zugeschmolzen wird.

Wright[434] hat eine sehr einfache Vorrichtung angegeben, um bei Verdrängung der Luft durch das Nährmedium Anaëroben gleichzeitig mit Aëroben züchten zu können. Eine Pipette mit kleinem Bauch-

stück ragt durch den Wattepfropf in ein Reagenzglas mit Bouillon hinein. Zwischen Bauch- und Halsteil der Pipette ist ein Stückchen Gummischlauch eingeschaltet. Nach Sterilisation und Impfung des ganzen Apparates wird die infizierte Flüssigkeit in die Pipette gesogen, bis sie oberhalb des Gummizwischenstückes steht. Durch Hineinschieben des oberen Rohrstückes in den Apparat wird das Gummizwischenstück geknickt. In dem auf diese Weise abgeschlossenen Bauch der Pipette gelingt die Züchtung anaërober Arten. Bei obligaten Anaëroben bleibt die Bouillon außerhalb der Pipette klar.

Reuschel [330] beschickt Kulturröhrchen mit $^2/_3$ Nährmedium und versieht die Oeffnung mit einem ungefähr 6 cm langen Gummischlauch in der Weise, daß der Schlauch die Mündung um ungefähr 3 cm überragt. Die Oeffnung wird mit Wattebausch verschlossen und das Ganze sterilisiert. Vor der Impfung treibt man die im Nährmedium gelöste Luft durch Kochen noch einmal aus, verimpft in die rasch abgekühlte Masse in üblicher Weise. Jetzt erwärmt man über der Bunsenflamme die oberen Flüssigkeitsschichten bis zum Sieden, das man einige Sekunden anhält. Noch während des Wallens wird der Schlauch mit einer Klemme zugequetscht und das Röhrchen zur Abkühlung bis zum oberen Rande des Nährmediums in ein Gefäß mit kaltem Wasser gestellt.

Biffi [21–23] verfährt ähnlich; sollen größere Mengen Nährmedium verwendet werden, so beimpft er mit der Pasteurschen Pipette ein mit Gummistopfen verschlossenes Erlenmeyerkölbchen, das mit Bouillon gefüllt und durch Auskochen luftleer gemacht ist.

Am gebräuchlichsten ist das folgende Verfahren:

γ) Verdrängung der Luft durch ein anderes Gas.

Dasselbe muß natürlich indifferent für das Wachstum sein. Dies ist bei Wasserstoff im wesentlichen der Fall, während andere Gase, wie Kohlensäure, Leuchtgas usw., nach Untersuchungen von Fränkel [110] u. a. die Mikroorganismen schädigen.

Die Züchtung unter Wasserstoff wurde zuerst von Hauser [155] empfohlen.

Die Herstellung des Gases erfolgt in einem Kippschen Apparat (Fig. 66). Das Gas passiert,

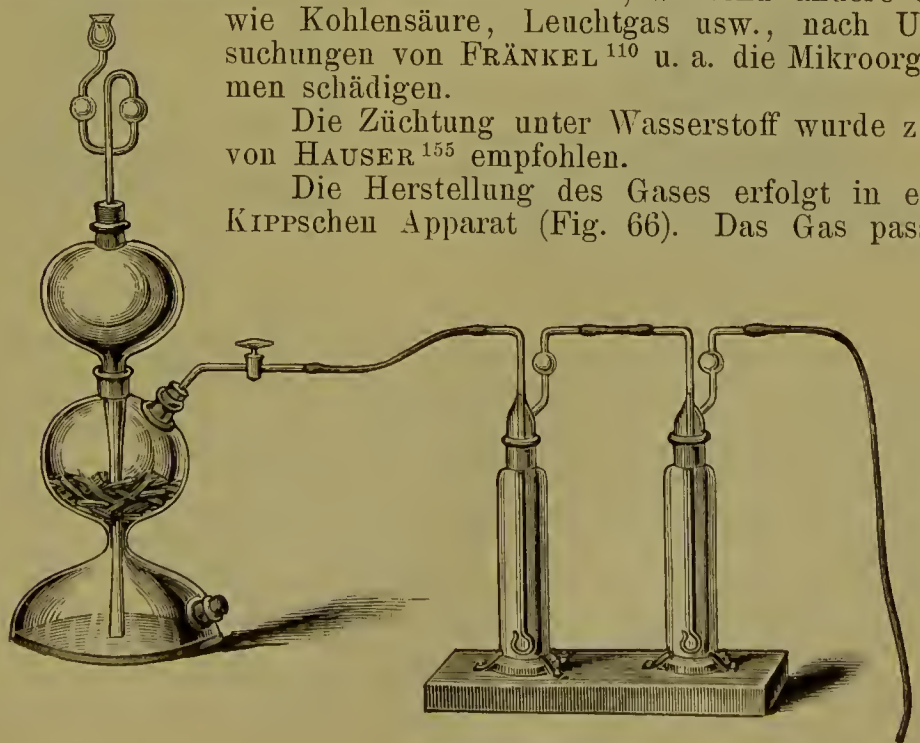


Fig. 66.

um vollständig von Säuredämpfen und Sauerstoff befreit zu werden, vor der Verwendung 2 Waschflaschen, die mit verdünnter Jod-Jodkalilösung resp. mit alkalischer Pyrogallussäure gefüllt sind.

Die Verdrängung der Luft durch den Wasserstoff findet im Prinzip in der Weise statt, daß mittels eines Zu- und Ableitungsrohres das Gas durch das im luftdicht verschlossenen Gefäß befindliche Nährmedium oder durch den Raum, in dem die geimpften Platten aufgestellt sind, durchgeleitet wird. Nachdem alle Luft verdrängt ist, wird zuerst die Zuleitungs- und dann die Ableitungsstelle luftdicht abgeschlossen.

Soll der Wasserstoff die Luft aus Reagenzgläsern oder Kölbchen, in denen sich das geimpfte Nährmaterial befindet, verdrängen, so benutzt man am einfachsten eine Versuchsanordnung, die von Hueppe [181] und C. Fränkel [109] unabhängig voneinander angegeben wurde. In der Oeffnung des Gefäßes (Fig. 67) sitzt ein mit zwei Durchbohrungen versehener Gummipfropfen; in der einen Durchbohrung steckt ein Glasrohr, das nur etwas über die Unterfläche des Gummipfropfens reicht und rechtwinklig abgebogen ist. Durch die andere geht ein gleichfalls rechtwinklig abgebogenes Rohr bis nahe auf den Boden des Gefäßes. Durch das letztere wird der Wasserstoff zugeleitet, und nachdem die Durchleitung genügend lange stattgehabt hat, werden beide Röhrchen an einer verengerten Stelle abgeschmolzen. Zur Durchleitung durch verflüssigte, feste Nährsubstrate stellt man das Kulturgefäß in ein Wasserbad von entsprechender Temperatur.

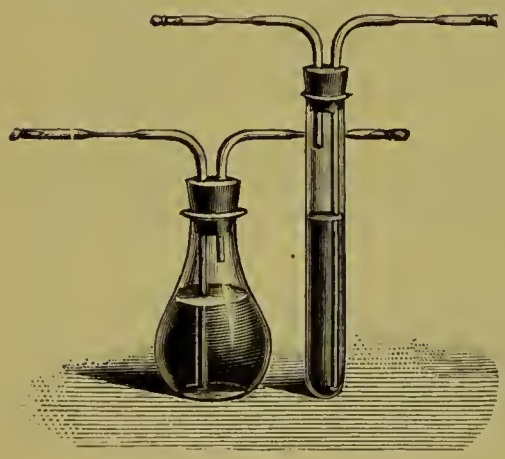


Fig. 67.

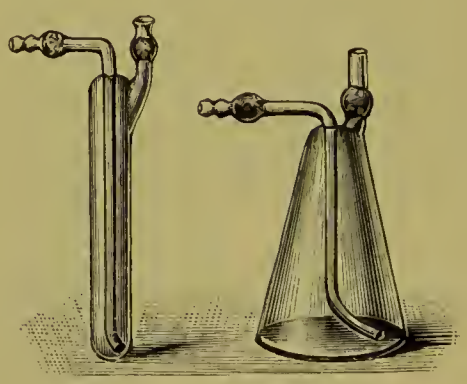


Fig. 68.

Auf dem gleichen Prinzip wie die Hueppeschen und Fränkelschen beruhend sind Gefäße von Petri & Maassen [310] angegeben (Fig. 68), bei denen Zu- und Ableitungsrohr angeblasen sind und der Verschluß durch Kautschukpfropfen am Ausführungsrohr und durch einen Gummischlauch mit eingeführtem Glasstab am Zuführungsrohr geschieht. Sehr einfach ist eine von Roux ausgebildete und von Heim (Lehrb.) modifizierte Methode für Reagenzglaskulturen, bei der nur die Zuleitung des Gases durch ein besonderes Rohr erfolgt. Das Reagenzglas wird nach der Impfung an seinem oberen Teil zu einer engen Röhre ausgezogen. Durch die Verengerung wird eine mit dem Kippschen Apparat verbundene Kapillare eingefügt und das Gas mittels dieser 5—10 Minuten durch das flüssige oder verflüssigte Nährmedium geleitet. Alsdann erfolgt die Zuschmelzung des Reagenz-

glases, ohne vorherige Unterbrechung der Durchleitung an der verengerten Stelle. Nur bei Anlage von Rollkulturen ist unmittelbar vor dem Verschließen das Kapillarröhrchen herauszuziehen.

Hesse gab das folgende Verfahren an, das sich jedoch nur für feste Nährböden in Reagenzgläsern eignet. Das geimpfte Reagenzglas wird, nachdem der Wattepfropf einige Zentimeter in das Glas hineingeschoben ist, umgekehrt und in Quecksilber eingetaucht. Nun leitet man mittels eines am Ende umgebogenen Glasröhrchens Wasserstoff in das Reagenzglas und entfernt das Rohr nach Verdrängung der Luft. Zur Züchtung bleibt das Reagenzglas umgekehrt in Quecksilber stehen.

Um Plattenkulturen in Wasserstoffatmosphäre zu züchten, ist es nötig, sie in einem luftdicht abgeschlossenen Raum aufzustellen, der eine Vorrichtung zum Zuleiten des Wasserstoffs und zum Ableiten der Luft besitzt. Als der Typus eines derartigen Apparates zum Aufbewahren von Platten unter Wasserstoffatmosphäre kann der Anaërobenapparat von Botkin[34] (Fig. 69) gelten. Er besteht aus einer Glasglocke, die in einer tiefen Untersatzschale steht und mit Bleirohr beschwert ist. Auf dem Boden der letzteren befindet sich ein Bleikreuz und darüber, von der Glocke bedeckt, ein Einsatz zur Aufnahme von Doppelschalen. In die Glocke wird auf der einen Seite ein U-förmig gebogener Schlauch, der mit einem Wasserstoffapparat in Verbindung steht, bis zu der Kuppe eingefügt und in der gewünschten Form durch einen eingesteckten Kupferdraht festgehalten. Ein ebenfalls U-förmig gebogener Schlauch, von dem nur ein kürzerer Schenkel unter die Glocke geht, dient zur Ausströmung des Gases. Die Dichtung der Glocke gegen die Schale erfolgt durch eine Schicht flüssigen Paraffins.

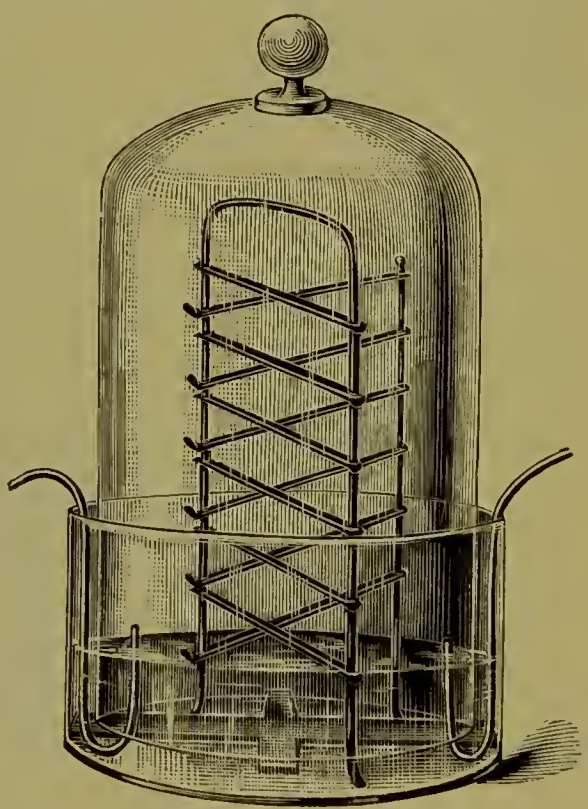


Fig. 69.

Nachdem im Botkinschen Apparat die geimpften Platten auf dem Gestell aufgestellt sind, kommt auf dessen unterste Etage eine Schale mit Pyrogallussäurelösung, der unmittelbar vor dem Aufsetzen der Glasglocke einige Tropfen Kalilauge zugefügt werden. Nunmehr wird Wasserstoff zugeleitet, die Ausströmungsöffnung aber bleibt vorerst verschlossen, so daß die Luft zunächst durch das Paraffin hindurch entweicht. Nach einigen Minuten öffnet man das Ableitungsrohr und entzündet das Gas an einem dort eingefügten, spitzverengten Glasrohr. Ist alle Luft verdrängt, so muß das Wasser-

stoffgas mit ruhiger Flamme brennen. Nunmehr wird die Gaszuleitung unterbrochen und die Schläuche werden herausgezogen.

Blücher[26] konstruierte einen ähnlichen Apparat, in dem der Abschluß statt durch Paraffin durch Glyzerinlösung bewirkt wird.

Im Prinzip dem Botkinschen Apparat ähnlich ist ferner der Apparat zur Anaërobenzüchtung von Hesse (Fig. 70). Er besteht aus einer Metallplatte mit einer breiten und tiefen Rinne, die zur Hälfte mit Quecksilber gefüllt ist. Ueber dieser Rinne steht eine Glasglocke, in die die Kulturgefäße zu stehen kommen. Die Füllung der Glocke mit Wasserstoff geschieht durch U-förmig gebogene Röhren, die unter das Quecksilber eingeschoben werden.

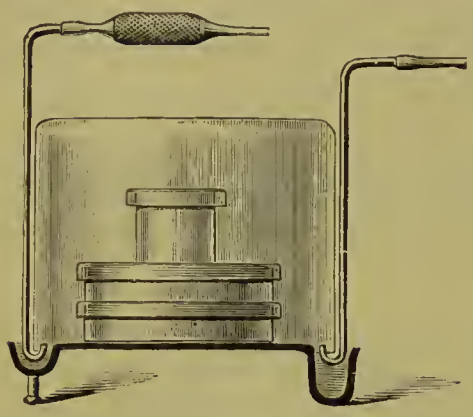


Fig. 70.

Um Einzelplatten unter luftdichtem Abschluß einer Wasserstoffatmosphäre auszusetzen, konstruierte Kitasato[207] (Fig. 71) ein flaches, birnenförmiges Gefäß, ähnlich den Kolleschen Schalen für Massenkulturen mit einer weiteren und einer gegenüberliegenden engeren Oeffnung. Durch die weitere Oeffnung erfolgt das Eingießen des verflüssigten, geimpften Nährmaterials und die Einleitung des Wasserstoffs mit Hilfe eines aufgesetzten Gummischlauches mit Glasrohr. Nach Durchleitung erfolgt Abschmelzung des Zu- und Ausführungsendes.

Fig. 71.

Arens[4] konstruierte eine ähnliche Vorrichtung, bestehend aus Schale mit aufgeschliffenem Deckel und luftdicht eingesetztem Zu- und Ableitungsrohr. Der dichte Abschluß des Deckels erfolgt durch Umlegen eines Gummibandes.

Andere Apparate der Anaërobenzüchtung unter Wasserstoff sind von Novy[288], Gabritschewsky[123 u. 121], Zettnow[440], Kamen[188], Epstein[91], Mereshkowsky[266], Berner[17], Pende und Viriani[304] u. a. angegeben.

c) Absorption des Luftsauerstoffs durch chemische Mittel.

Bei den bisherigen Verfahren wurde die Luft mechanisch ausgetrieben und eventuell durch ein anderes Gas ersetzt. Eine andere Methode beruht darauf, den für die Anaërobenzüchtung allein schäd-

lichen Bestandteil der Luft, den Sauerstoff, durch Absorption zu entfernen. Es geschieht dies durch alkalische Pyrogallussäure. Die Bakterien wachsen dann in der übrigbleibenden Atmosphäre. Buchner[46] hat dies Verfahren zuerst angewandt. Er bringt in ein reagenzglasähnliches Gefäß (Fig. 72) 1 g Pyrogallussäure und dazu mit einer Pipette 1 ccm einer $^1/_{10}$-proz. Kalilauge. Auf dem Boden des Gefäßes befindet sich ein kleines Drahtgestell, auf das nunmehr das geimpfte Reagenzglas zu stehen kommt, nachdem sein Wattepfropfen etwas gelockert ist. Das Ganze wird mit einem luftdicht schließenden Gummistopfen verschlossen, der noch mit Paraffin abgedichtet werden kann. Es erfolgt nun im Innern des Apparates eine Absorption des Sauerstoffs durch die alkalische Pyrogallussäure. Um ein Wachstum hintanzuhalten, solange noch Sauerstoff vorhanden ist, kann man die geimpften Röhrchen zunächst einige Zeit auf Eis stellen.

Fig. 72.

An Stelle des Buchnerschen reagenzglasähnlichen Gefäßes zur Aufnahme von Kulturglas und Pyrogallussäure verwendet Omelianski[293] einen starkwandigen Glaszylinder von 150 ccm Inhalt, 20 cm Höhe, 1,8 cm Durchmesser, der oben einen Kragen von 5,5 cm Durchmesser trägt, und unten sich zu einem Fuß von 8 cm Durchmesser erweitert. Auf den oberen verjüngten Teil des Zylinders ist ein Helm aufgeschliffen. In den Zylinder werden 10 ccm 2,5-proz. Kalilauge und 10 ccm 5-proz. Pyrogallollösung gegossen, dann wird das geimpfte Reagenzglas (16 cm Länge, 16 mm Durchmesser) eingestellt und der Helm aufgesetzt. (Vorher einfetten mit einer Mischung von 1 Teil Wachs und 2 Teilen Vaseline.) Der Kragenraum wird zum Luftabschluß mit Quecksilber ausgegossen, das vor dem Oeffnen des Apparates zu entfernen ist, damit es nicht bei Druckdifferenzen nach innen gesaugt wird. Ein Ueberdruck im Innern gleicht sich dadurch aus, daß der Helm sich etwas hebt. Bei reichlichem Quecksilberabschluß ist dabei Eindringen von Luft nicht zu befürchten. Die Absorption des Sauerstoffs dauert anderthalb bis zwei Stunden.

Die Absorptionsmethode eignet sich auch für Platten, die man nach Arens (l. c.) unter einen luftdicht abschließbaren Exsikkator bringt, in dem sich die alkalische Pyrogallussäure befindet.

Emmerling[90] und Bordet[31] verbinden die beiden üblichen Methoden der Evakuierung und Absorption zur Herstellung eines sauerstofffreien Raumes. Letzterer verfährt folgendermaßen: Nachdem die Kulturen in ein zylindrisches Glasgefäß gestellt sind, wird auf dieses eine Glasglocke gestülpt, deren Boden in der Mitte eine Oeffnung mit nach innen erhöhtem Rande besitzt und die ein mit einem Hahne versehener Stopfen schließt. Vorher hat man ein Stück mit Pyrogallussäure getränktes Fließpapier auf den Boden der Glocke gelegt. Der Apparat wird schief gestellt, das Fließpapier an die höchste Stelle des Bodens gebracht, Aetzkali in die Glocke gegossen, so daß das Fließpapier nicht getroffen wird. Nun wird die Luft möglichst ausgepumpt, dann das Gefäß horizontal gestellt, wodurch sich Aetzkali und Pyrogallussäure mischen und die letzten Spuren von Sauerstoff absorbieren.

Klein[211] stellt die anaërob zu züchtenden Platten unter eine Glasglocke, die unten gegen eine Glasplatte abgedichtet ist. Durch eine Tubulatur in der Glasglocke erfolgt die Evakuierung mittels einer Wasserstrahlluftpumpe. Unter der Glocke steht ferner eine U-förmige Röhre mit einem geschlossenen und einem offenen Schenkel, die mit 60-proz. Kalilösung gefüllt ist. Unter dieser Röhre liegt trockene Pyrogallussäure angehäuft. Beim Auspumpen der Luft steigt die Kalilauge im offenen Schenkel in die Höhe und ergießt sich durch einen angeschmolzenen Glasheber auf die Pyrogallussäure.

Da bei diesem Verfahren das Verhältnis der absorbierenden Fläche zum Luftinhalt ein nicht sehr günstiges ist, hat Slupsky[382] unter Berücksichtigung dieses Faktors einen Apparat konstruiert, bei dem eine möglichst große absorbierende Fläche einem geringen Luftinhalt entspricht. Die geimpfte Agarschale kommt offen auf einem Dreifuß in eine große Schale über ein Gefäß mit alkalischer Pyrogallussäure zu stehen, über die Platten und die Schale mit der Pyrogallussäure kommt eine Glasglocke mit aufgeschliffenem Rand. Der Raum zwischen der Außenwand dieser Glocke und der Innenwand der Schale wird mit Paraffin ausgegossen, wodurch ein Eindringen der Luft vermieden wird.

Verfahren von Hammerl[147, 148]: Es werden 20 g Pyrogallol in einem Becherglas mit 15 ccm einer 50-proz. Kalilauge (Kali causticum in Wasser oder besser noch in frisch bereitetem Schwefelwasserstoff gelöst) übergossen und mit dieser Lösung ein Bierfilz getränkt. Dieser kommt auf den Boden einer Glasdose von 12 cm Durchmesser, 9,5 cm Höhe und etwa 1070 ccm Inhalt auf niedere Leisten zu liegen. Ueber dem Bierfilz werden die geimpften Platten offen aufgestellt. Dann wird die Schale mit einem Deckel, der eine der Wandstärke der Schale (4—5 mm) entsprechende Rinne hat, bedeckt. Zum luftdichten Abschluß ist die Rinne vorher mit einer aus 20 Teilen Wachs und 80 Teilen Talg bereiteten Mischung, ausgestrichen.

Hammerl (l. c.) züchtete Anaëroben mittels des Verfahrens der Sauerstoffabsorption durch Pyrogallussäure auch direkt in Petrischalen. Er benutzte Schalen, die einen sorgfältig aufgeschliffenen Deckel haben und befestigte an der Innenseite des Deckels mit Wachs oder Paraffin eine Platte aus dickem, porösem Papierstoff, die er mit alkalischer Pyrogallussäurelösung tränkte. Das Ganze verschloß er durch ein Gummiband.

Turró[406] benutzt zur Isolierung von Anaëroben sterilisierte Kristallisierschalen von geringem Durchmesser und 2—3 cm Höhe. Der Deckel ist eingeschliffen; um ihn zu stützen, sind auf der inneren Wand des Schälchens drei Ständer angeschmolzen. Auf der Unterseite der Schale wird zuerst luftfreie Gelatine oder Agar zu einer Kochschen Platte erstarrt und ihre Oberfläche mit der Verdünnung des bakterienhaltigen Materials (durch Uebergießen) beimpft. In die Schale kommt etwas Pyrogalluslösung nebst einem Stückchen Aetznatron oder Aetzkali. Der Deckel wird aufgelegt und mit geschmolzenem Wachs oder Paraffin gedichtet. Zur Kultur in flüssigen Nährböden unter Pyrogallol benutzt Turró besondere Kugelröhren. Dieselben bestehen aus Probierröhren, welche in der Mitte eine kugelförmige Erweiterung tragen. Der untere Abschnitt, welcher die Nährflüssigkeit aufnimmt, ist nach der Kugelerweiterung zu abgeschlossen

und steht nach oben mit dem oberen Röhrenabschnitt nur durch eine enge Röhre in Verbindung, welche die Kugelerweiterung durchsetzt. Er wird durch das enge Röhrchen beimpft. Die Kugel wird zu $^1/_4$—$^1/_5$ mit Pyrogallussäurelösung und Aetzlauge gefüllt und der Apparat durch Gummistopfen geschlossen. Vorsichtiges Schütteln beschleunigt die Absorption des Sauerstoffes.

Unter Benutzung gewöhnlicher Reagenzgläser verfährt Kürsteiner[227] in folgender Weise: „Der sterile, nicht entfettete, das Reagenzglas schließende Wattepfropf wird nach der Impfung des ausgekochten flüssigen Nährbodens abgeflammt, die verkohlte, aus dem Gläschen ragende Watte mittels Schere abgeschnitten und nun der so behandelte sterile Wattepfropf mittels Pinzette ziemlich weit ins Gläschen hineingestoßen. Auf diesen sterilen Wattepfropf stößt man einen entfetteten, hygroskopischen Wattebausch, der nicht unbedingt steril zu sein braucht, da der unter ihm sich befindende sterile Wattepfropf einen vollständig genügenden sterilen Abschluß bietet.“ Von je einer Lösung von 20 g fester Pyrogallussäure in 100 ccm destilliertem Wasser und 20 g Stangen-KOH in ebenso viel Wasser kommt auf den zweiten Wattebausch je 1 ccm und hierauf wird das Reagenzglas sofort mit einem gut passenden benetzten Gummistopfen geschlossen. Kürsteiner hat auch doppelteilige Kulturgläschen angegeben, die gestatten, eine zweite Kultur zu impfen, ohne das übertragene Impfmaterial mit der Luft in Berührung zu bringen und der Luftinfektion auszusetzen.

Lentz[236] legt die Kultur in einer gewöhnlichen Petrischale auf Agar an, bringt auf eine Glasplatte einen Pyrogallusfließpapierring (Pyrogallolfilz) (Fig. 73) an und umgibt den Filz außen mit Plastilin. Der Filz wird mit 15 ccm einer 1-proz. wässerigen Kalilauge getränkt und die Kulturschale sofort mit der Oeffnung nach unten über den Filz gestülpt und in das Plastilin eingedrückt (Fig. 74). (Der Filz und das

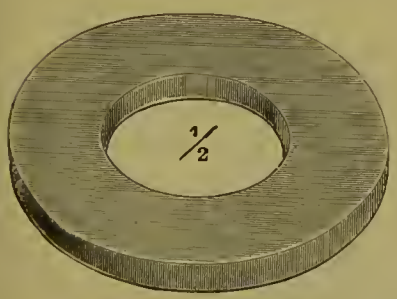


Fig. 73.

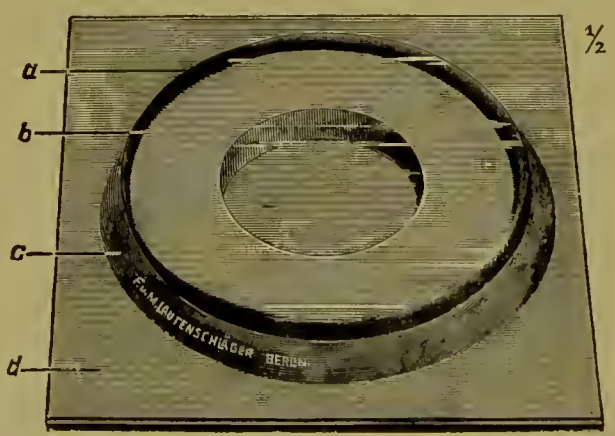


Fig. 74.

Plastilin braucht nicht sterilisiert zu werden, es genügt ein Abputzen der Glasplatte mit sauberem Tuch und Durchziehen durch die Flamme.) Auch für Röhren und Kölbchen läßt sich das Verfahren anwenden, es tritt hierbei an Stelle des Filzringes eine Filzrolle (Fig. 75 a u. b).

Heim[160] hat das Lentzsche Verfahren in der folgenden Weise modifiziert: „Ein Schalenpaar gibt zwei Kulturen. Dazu sind Glas-

platten nötig, deren Durchmesser etwa 3 cm größer ist als der des Schälchens. Für jede nimmt man 10 g Plastilin, rollt es zu einer Stange von 30 oder 32 cm Länge aus und bildet damit auf jeder Platte einen Kreis von genau dem Durchmesser der zu verwendenden Schale. In jeden Kreis wird etwa 0,5—0,7 g entfettete Watte gelegt, die mit Wasser befeuchtet und wieder gut und flach ausgedrückt worden ist; es muß der größere Teil der Glasfläche für die spätere Beobachtung der Kultur freigelassen werden. Ein solcher Bausch vermag 4—6 ccm Flüssigkeit zu fassen. Auf ihn wird eine frisch bereitete Lösung von etwa 0,7 g Pyrogallol in 1—1½ ccm heißem destilliertem Wasser gegossen, dann impft man den Nährboden z. B. mit einem keimhaltigen Seidenfaden, hält die bestrichene Schale mit der Nährbodenschicht nach unten über die Watte, gießt etwa 4—5 ccm Kalilauge darüber, drückt sogleich die Schale in den Plastilinkreis und dichtet durch Verstreichen sorgfältig ab. Da nicht sporentragende Anaërobier durch den Sauerstoff der Luft geschädigt werden, muß nicht bloß die Impfung kurz vor Abschluß der Schale, also unmittelbar vor dem Aufgießen der Kalilauge gemacht werden, sondern auch eine allenfallsige Abimpfung von der später gewachsenen Kultur bald nach der Oeffnung des Verschlusses stattfinden. Man kann Schalen jeder Größe nehmen, für größere braucht man entsprechend mehr Watte, Pyrogallol und Lauge."

a b

Fig. 75.

Ruzickas[347] Methode zur Herstellung sauerstofffreier Luftatmosphäre besteht darin, daß die Kulturen durch eine aufgestülpte Glasglocke, welche in eine sauerstoffbindende Flüssigkeit eintaucht, mit einem bestimmten Luftvolum abgeschlossen werden, jedoch läßt Verfasser im Gegensatz zu den früheren Methoden den Sauerstoff durch ein Flämmchen aufzehren und nur den Rest durch alkalische Pyrogallollösung absorbieren.

Weitere Verfahren der Anaërobenzüchtung unter Verwendung der Progallussäure wurden angegeben von Fermi und Bassu[100—102], Stüler[395] und Crendiropoulo[68], der die Methode mit der Vertreibung der Luft durch Wasserstoff kombinierte.

Sellards[376] benutzte Phosphor, Kulka[225] Natriumhydrosulfit als Sauerstoffabsorptionsmittel: Für ein Buchnerrohr löst er 1½—2 g Natriumhydrosulfit in 10 ccm 40° heißen Wassers und setzt 20 ccm 5-proz. Natronlauge zu. Nach 4 Stunden tritt ohne Schütteln völlige Absorption ein.

Ebenfalls auf einem Reduktionsvorgang beruht das Tarozzische[399] Züchtungsverfahren: 1 ccm große, steril entnommene

Stückchen von Leber, Milz, Niere oder Muskelgewebe werden in Bouillonröhrchen eingelegt und diese 1—2 Tage bei 37° zur Ausschaltung verunreinigter Röhrchen gehalten. Hier wachsen Anaërobe ohne weitere Kautelen.

Calderini [54], Wrzosek [435—438], Rolly [334] u. a. konnten die Brauchbarkeit der Tarozzischen Methode durchaus bestätigen.

Wrzosek gelang die Kultur auch durch Zusatz von Pflanzengewebe (Kartoffel) zur Bouillon, eine 15 Minuten lange Sterilisation auf 140° hatte keine nachteilige Wirkung. Auch Harras [151] sterilisierte 1—2 Stunden in strömendem Dampf, ohne eine Schädigung zu beobachten.

Nach Liefmann [241 u. 242] gelingt es durch Zusatz von 0,1 ccm einer 10-proz. Ferroammoniumsulfatlösung zu einem fertigen sterilisierten Bouillonröhrchen ein gutes Wachstum anaërober Keime zu erzielen.

Hata [154] fand, daß die Anaëroben in Bouillon wachsen, die mit 0,3—0,7 Proz. Na_2So_3 versetzt ist, wenn sie mit Agarstückchen zusammen eingeführt werden. In Bouillon mit Eisensulfat ohne Agarstückchen ist genau das gleiche der Fall, doch verlieren die Bakterien bald ihre Virulenz.

Pfuhl [314] züchtete Anaëroben in gewöhnlicher Bouillon oder 1—2-proz. Traubenzuckerbouillon, der Platinschwamm oder Hepin als Katalase zugefügt worden war.

4. Züchtung der Anaëroben im hängenden Tropfen.

Mit Hilfe der Absorptionsmethode kann man in sehr einfacher Weise Anaërobenkulturen im hängenden Tropfen anlegen. Man bringt zu dem Zweck an die eine Seite des Ausschliffrandes eines hohlgeschliffenen Objektträgers einen Tropfen Pyrogallussäure, an eine

Fig. 76.

benachbarte Stelle einen Tropfen Kalilauge, legt das Deckglas mit dem hängenden Tropfen über und mischt die beiden an dem Rande befindlichen Tropfen durch geeignetes Neigen des Präparates, ohne

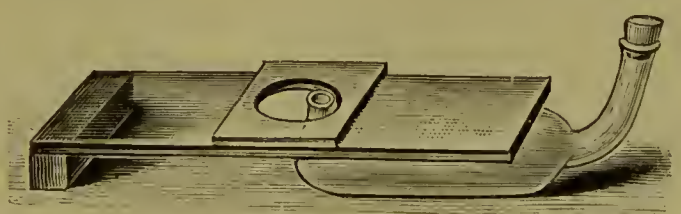


Fig. 77.

den hängenden Tropfen mit der Mischung in Berührung zu bringen (Nikiforoff [286]). Besser benutzt man statt der gewöhnlichen hohlgeschliffenen Objektträger solche nach F. E. Schulze, die mit einer Rinne an der Peripherie des Ausschliffs ausgestattet sind (Fig. 76).

Braatz[36] konstruierte zur Anaërobenbetrachtung einen Objektträger, dessen Ausschliff mit einem Gefäß in Verbindung steht, das mit alkalischer Pyrogallussäure gefüllt ist (Fig. 77).

Streng[394] empfiehlt, um die mikroskopische Betrachtung der Anaërobenkulturen im Reagenzglas zu ermöglichen, Reagenzgläser, die an der Mündung auf etwa 2 cm wie gewöhnliche Reagenzgläser aussehen, im übrigen jedoch abgeplattet sind (angefertigt von C. Zeiss-Berlin).

5. Züchtung der Bakterien bei konstanter Temperatur.

Der Thermostat.

Die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Nährböden bedürfen nach der Beschickung für die Auskeimung der Mikroorganen meist gewisser für das Wachstum optimaler Temperaturen. Zu diesem Zweck bringt man die Kulturen in Thermostaten, die konstant auf passende Wärmegrade eingestellt sind. Die Thermostaten oder Brutschränke (Fig. 78) sind doppelwandige, mit einer schlecht wärmeleitenden Hülle umgebene Metallkästen, zwischen deren Wänden sich Wasser befindet. Den Zutritt zum Innern vermitteln wohlverschließbare Doppeltüren. Der Innenraum ist in mehrere Etagen abgeteilt. Die Erwärmung geschieht von unten am besten durch Gas mittels eines Kochschen Sicherheitsbrenners (Fig. 79). Ein Durchschlagen der Flamme ist bei diesen Brennern dadurch vermieden, daß an der Gasausströmungs- und Luftzuführungsöffnung ein Drahtnetz angebracht ist. In die Flamme ragt eine Feder hinein, die vermöge ihrer Ausdehnung einen mit einem Gewicht belasteten Hebelhahn horizontal festhält. Beim zufälligen Auslöschen der Flamme findet dieser an der sich abkühlenden und zusammenziehenden Feder keine Stütze mehr und führt einen automatischen Abschluß der Gaszufuhr herbei. Beim Anzünden der Flamme wird der Hebelarm so lange horizontal gehalten, bis er durch die Ausdehnung der Feder eine genügende Stütze findet, um in dieser Lage zu beharren.

Kaspareck[191] benutzt als Wärmequelle für Brutschränke Auerbrenner, die ruhiger brennen, nicht rußen und den Heizraum zugleich beleuchten.

Da, wo kein Gas vorhanden ist, erfolgt die Erwärmung durch Petroleum oder Elektrizität. Brutschränke für elektrische Heizung können an jede Lichtleitung angeschlossen werden.

Landois hat einen regulierbaren Thermostaten angegeben, der mit Stearinlichtern geheizt wird.

Zur Regelung der Wärmezufuhr für die Flamme dient ein Thermoregulator. Die schnellste Regulierung gestattet ein Quecksilberthermoregulator. Der gebräuchliche Lautenschlägersche elektrische Thermoregulator (Fig. 80, S. 448) hat folgende Konstruktion: In die luftleere Kapillare oberhalb des Quecksilberreservoirs *K* sind zwei Platindrähte *a* und *b* eingefügt, über ihnen befindet sich ein Glaswiderstand *c*, der jedoch dem aufsteigenden Quecksilber die Passage frei läßt. Beim Fallen des Thermometers aber reißt der Quecksilberfaden an der Stelle des Widerstands. Das untere Stück tritt in die Kugel zurück. Ist das Thermometer in Funktion und gelangt die untere Quecksilbersäule bis an den oberen Poldraht *b*, so tritt Stromschluß ein und die Gaszufuhr wird dann vermittels eines mit dem Thermo-

meter verbundenen Gasschließers abgestellt. Verläßt die Quecksilbersäule bei Sinken der Temperatur wieder den Poldraht *b*, so öffnet

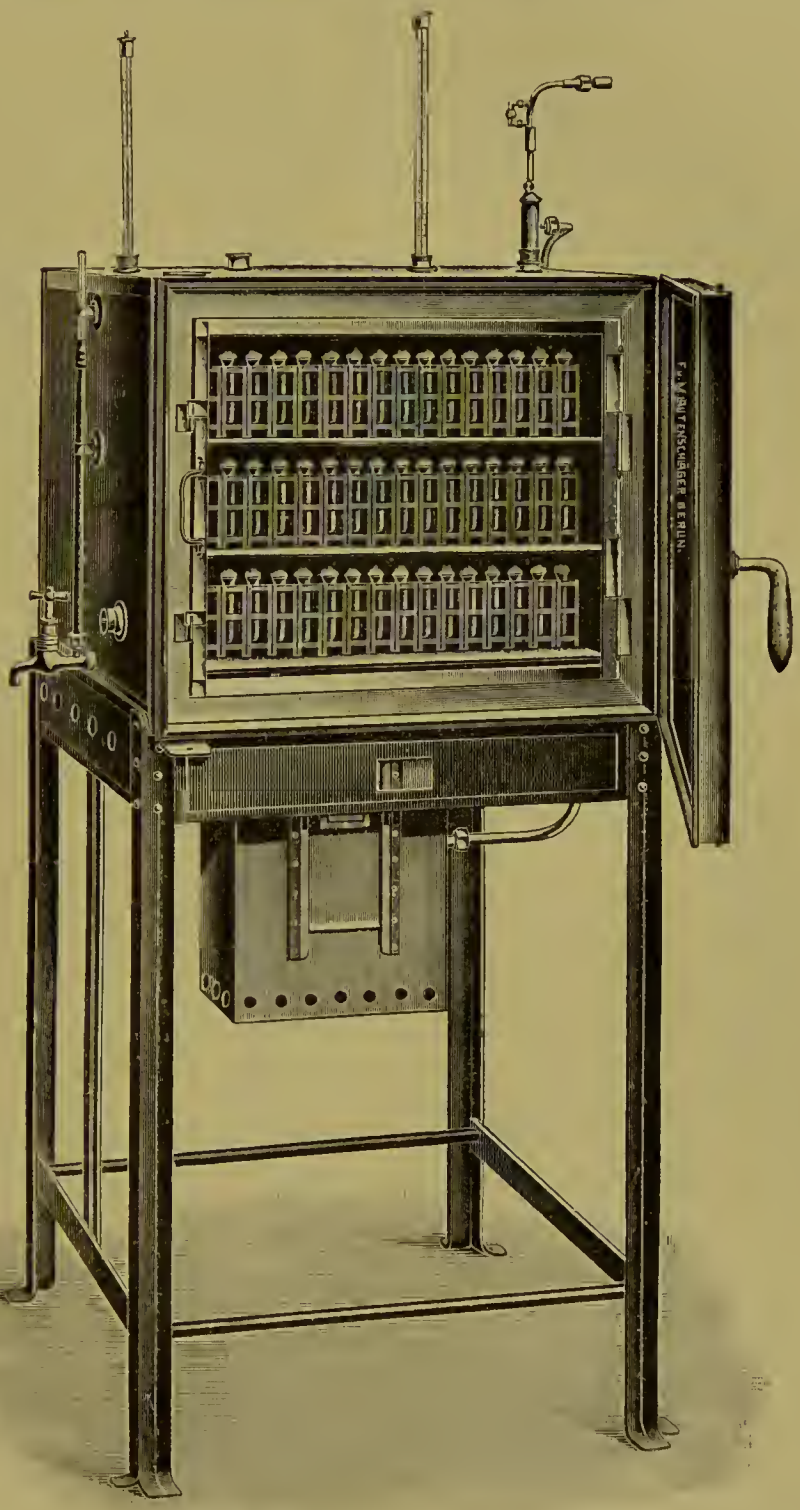


Fig. 78.

sich der Strom und die Gaszufuhr ist wieder frei. Der Gasschließer besteht aus einem Hebelarm mit Eisenkern, der bei Stromschluß

von einem Elektromagneten angezogen wird, wodurch die Gaszufuhr reguliert wird.

Von den zahlreichen Gasthermoregulatoren sind die gebräuchlichsten die auf dem Prinzip des Lothar Meyerschen beruhenden.

Der Spiralthermoregulator nach Lautenschläger (Fig. 81) besteht aus einem geschlossenen Glasrohr *G*, in dessen Unterteil eine offene Glasschlange *S* so eingeschmolzen ist, daß ein Regulierraum *R* entsteht, der das Quecksilber und die Regulierflüssigkeiten aufnimmt. Auf das Glasrohr *G* ist der Metallkopf *T* aufgesetzt, bestehend aus zylindrischem Rohr mit Stopfbüchse und gasdicht verschiebbarem Metallrohr. Zur Regulierung der Notöffnung *n* dient eine Zweigleitung mit Absperrhahn *H*.

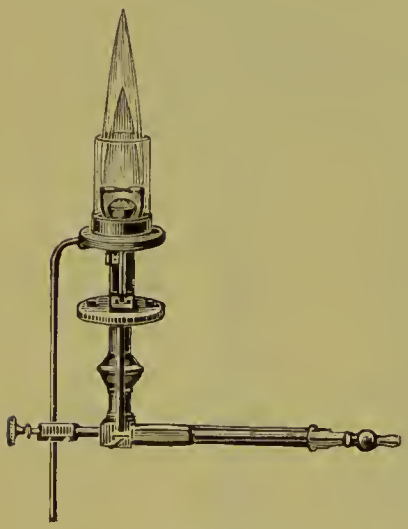


Fig. 79.

Fig. 80.

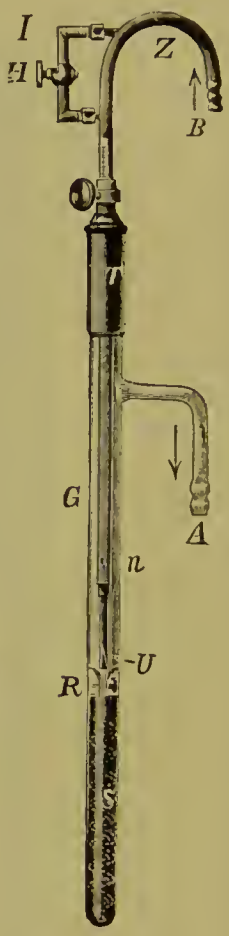


Fig. 81.

Die Inbetriebsetzung ist folgende: Der Glaskörper *G* wird in den Wasserraum des Brutapparates eingeführt und in eine Metallhülse mit Zirkulationsvorrichtung so gestellt, daß er sich nicht bewegen kann. *A* wird mit dem Brenner, *B* mit der Gasleitung verbunden. Sobald das Thermometer im Wasserraum des Apparates eine Temperatur anzeigt, die ungefähr 1,5—2° C unter dem einzustellenden Wärmegrad liegt, beobachtet man den Brenner und schiebt langsam und vorsichtig das Rohr *Z* so tief in das Quecksilber hinein, daß der Schlitz *U* vollständig verschwindet und nur durch die Reserveöffnung *n* Gas zum Brenner gelangen kann. Der Schlitz *U* des Metallrohres ist nicht sichtbar; man kann bei ganz allmählichem Einschieben des Rohres an dem Kleinerwerden der Flamme

erkennen, ob die Hauptgaszufuhr abgesperrt ist. Jetzt ist die Notflamme, die höchstens 20 mm hoch brennen darf, durch Drehen des Hahnes *II* auf diese Höhe einzustellen. Der Brenner selbst muß mindestens 150 mm vom Boden des Apparates entfernt sein. Steigt die Temperatur noch, dann ist entweder die Notflamme kleiner zu stellen oder das Gaszuführungsrohr *Z*, das mit Teilung versehen ist, um 1 mm und nach Bedarf noch weiter einzuschieben. Fällt dagegen die Temperatur unter den gewünschten Wärmegrad, dann ist das Rohr *Z* entsprechend mehr nach oben zu verschieben.

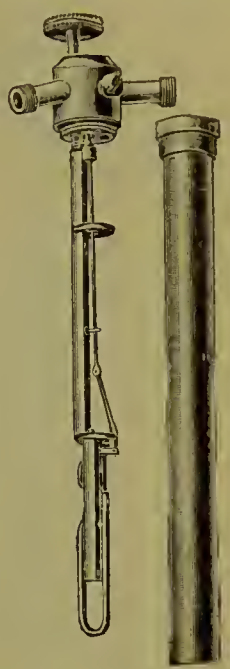


Fig. 82.

Der neue Thermoregulator von Leitz (Fig. 82) ist ganz aus Metall, ohne Glasteile und Quecksilber, und hat den Vorzug der Unzerbrechlichkeit. Nach erfolgter Einstellung hält er die Temperatur des Thermostaten genau auf $^1/_{10}$ Grad konstant. Er besteht im wesentlichen aus einer Feder, die sich mechanisch ausdehnt oder zusammenzieht, hierdurch wird die Gaszufuhr verschlossen resp. geöffnet. Die Regulierung der Temperatur geschieht durch die obere Schraube. Die Notflamme wird durch eine seitliche Schraube eingestellt.

Gabritschewski [122] versucht Thermostaten für beliebige Temperatur in einem Apparat mit Heizvorrichtung zu vereinigen. Er benutzt als polythermalen Apparat eine dem Ehrlichschen Fixierkupferblech entsprechende Kupferplatte, die an einem Ende durch einen Gasbrenner erhitzt wird und auf der an verschieden weit von dem Flammenende entfernten Stellen Temperaturen von 65—20° sich zur Züchtung ausnutzen lassen. Durch Aufstellen von doppelwandigen, im Außenteil mit Vaseline gefüllten Zylindern auf dem polythermalen Kupferblech lassen sich die gewünschten Temperaturen auch gleichmäßig in verschieden hohen Schichten über die Kupferplatte erhalten. Bei den Thermostaten mit zentralem Ofen erreicht man die Polythermie dadurch, daß man verstellbare Etageren verschieden weit vom Ofen aufstellt. Endlich hat Gabritschewski aus Kupfer einen zylindrischen Polythermostat mit übereinanderliegenden Abteilungen konstruiert, der nur eine Heizvorrichtung und einen Thermoregulator besitzt. Zur Erzeugung einer gleichmäßigen Temperatur in den verschiedenen Luftschichten der einzelnen Abteilungen können hier die beschriebenen Doppelzylinder mit Vaseline eingestellt werden. [Die Polythermostaten sind nach den Angaben vom Verfasser konstruiert durch Schwabe (Moskau), Lautenschläger (Berlin) und Wieseneg (Paris) zu beziehen.]

Handelt es sich darum, bei einem Brutschrank abwechselnd verschiedene Temperaturgrade zu erzeugen, so empfiehlt es sich, nach M. Neisser eine Batterie von verschieden eingestellten Thermoregulatoren vorrätig zu halten und jeweils den bestimmten zu benutzen.

An Stelle des Einzelbrutschrankes kann da, wo es sich um Züchtung von Bakterien in großen Massen handelt, die Brutkammer treten. Die Wände bestehen aus schlechtleitendem Material, die Heizung erfolgt am besten durch einen kleinen Gasofen mit Thermoregulation. Die Temperatur soll jederzeit von außen ablesbar sein.

Ein einfacher Brutapparat für die Bedürfnisse des praktischen Arztes ist von Walz[420] angegeben worden. Die Erwärmung erfolgt durch einen Einsatz, der mit Thermophormasse (essigsaures Natron) gefüllt ist. Vor dem Gebrauch wird der Einsatz für kurze Zeit in kochendes Wasser gesetzt. Beim Auskristallisieren des essigsauren Natrons wird die Wärme an den Brutofen allmählich abgegeben.

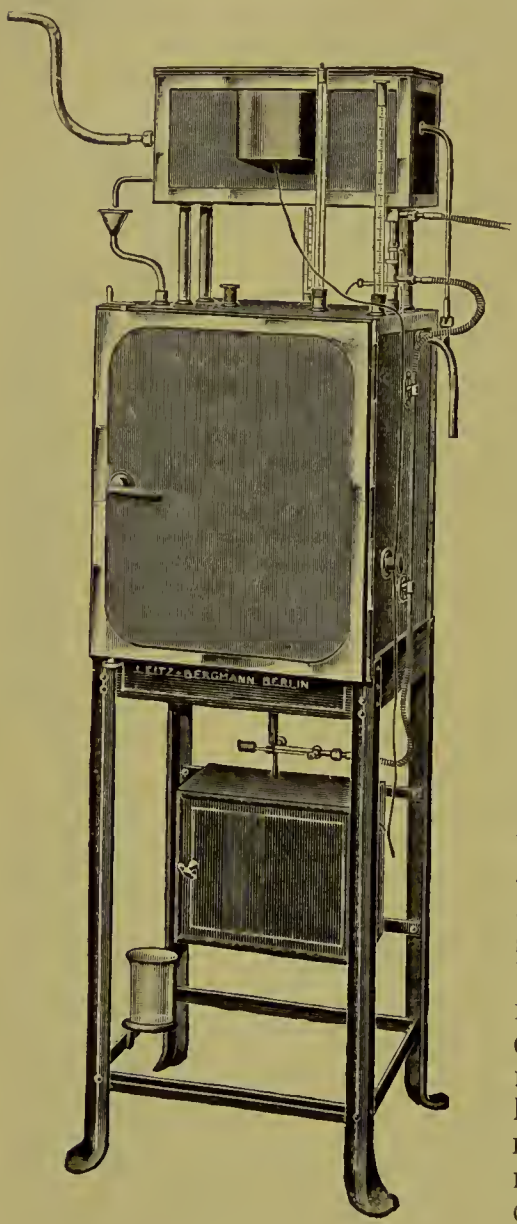


Fig. 83.

Man braucht für den gewöhnlichen Betrieb zwei Brutschränke, von denen der eine für Agarböden auf 37° eingestellt ist und der zweite für Gelatinenährböden die konstante Temperatur von 22° hat.

Der Brutschrank für Gelatinekulturen bei niederer Temperatur nach Bitter & Kolle (Fig. 83) besteht aus Brutschrank, Kaltwasseraufsatz mit Schwimmkugelventil, Elektromagnet und Ablaufventil.

Die Auslösung des Schwimmventils erfolgt durch Kontaktthermometer, das mit dem Elektromagneten verbunden ist; im Fuße des Apparates sind die Elemente untergebracht.

Der Gasbrenner ist mit Thermoregulator verbunden, damit der Wasserverbrauch möglichst eingeschränkt wird.

Der Brutapparat nach Hertwig ist für Temperaturen von 3—12° C bestimmt. Er besteht aus einem Brutschrank, der in einen starken Isolationsschrank eingebaut ist und einem Eisbehälter mit einer Vorrichtung, die das durchlaufende Wasser auf eine möglichst niedrige Temperatur abkühlt. Die automatische Regulierung des Wasserzuflusses erfolgt mittels einer elektrischen Auslösung durch ein Relais.

Die geimpften Kulturen werden für bestimmte Zeit, je nach der Wachstumsenergie, die bei den einzelnen Bakterienarten schwankt, in den Brutschrank eingestellt. Um bei langsam wachsenden Arten eine Eintrocknung des Nährmediums zu verhindern, überzieht man Reagenzglaskulturen mit einer Gummikappe (zu empfehlen konische Gummikappen nach P. Kaufmann), Petrischalen mit einem eng anschließenden Gummiring. Hesse benutzt bei langsam wachsenden Bakterien, um ein Eintrocknen des Schaleninhaltes zu vermeiden, hochrandige Petrischalen, die er nach Impfung ihres Inhalts umkehrt. Auf die Innenseite der jetzt als untere Schale dienenden Deckschale

kommt ein niederes Gefäß mit Wasser. Dadurch ist wochenlange Züchtung bei 37° ohne Austrocknung ermöglicht.

Da der Agar die Eigentümlichkeit besitzt, beim Erstarren Wasser auszupressen, das nachher im Brutschrank sich an dem Deckel der Petrischalen kondensiert und über die Oberfläche der Platten laufend die Keimtrennung illusorisch macht, so stellt man Agarplatten allgemein umgekehrt in den Brutschrank ein.

6. Methoden der Herstellung von Reinkulturen.

Ist auf Platten ein sichtbares Kolonienwachstum erfolgt, so werden sie aus dem Brutschrank herausgenommen, um die einzelnen Arten zu isolieren und rein zu züchten. Zu diesem Zweck betrachtet man die Platten zunächst bei schwacher Vergrößerung unter dem Mikroskop und sucht Aufschluß zu gewinnen über die Zahl der vorhandenen, verschiedenartig aussehenden Kolonien. Von diesen sucht man möglichst isoliert liegende aus, von denen Ausgangsmaterial zu Reinkulturen entnommen wird.

Man stellt eine solche, isolierte, am besten oberflächliche Kolonie scharf ein, entnimmt mittels einer ausgeglühten Platinnadel unter Kontrolle des Mikroskops einen Teil der Kolonie und überträgt diesen, nachdem man sich davon überzeugt hat, nur von einer Kolonie entnommen zu haben, auf ein Röhrchen mit schräg erstarrtem Nährboden, indem man den Draht vorsichtig darüber hinführt (Strichkultur), oder man sticht den infizierten Draht von oben in ein Röhrchen mit gerade erstarrtem Nährboden ein (Stichkultur). Wurde sicher nur von einer Kolonie abgeimpft, so wird eine Reinkultur der betreffenden Art in Stich- resp. Strichkultur erzielt. Soll die Stichkultur der mikroskopischen Untersuchung zugänglich gemacht werden, so legt man sie nahe der Wand des Reagenzglases an (Kràl).

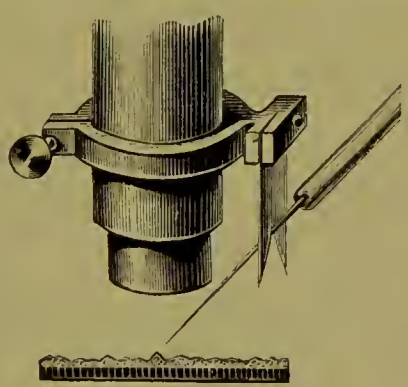
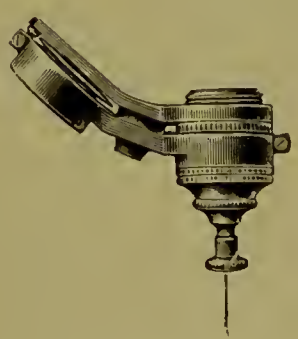


Fig. 84.



Fig, 84a.

Das Entnehmen von isolierten Kolonien, das „Fischen", kann man sich dadurch erleichtern, daß man dem abimpfenden Platindraht einen Stützpunkt verleiht. Zu dem Zweck hat Prausnitz[323] mittels eines Ringes ein kleines Metallblech mit Einschnitt am Objektiv angebracht (Fig. 84). Unna hat ferner eine Bakterienharpune angegeben (Fig. 84a), die nach Einstellung der Kolonie an Stelle des Objektivs an den Revolver angeschraubt wird und beim Senken des Tubus die gewünschte Kolonie aussticht. Freymuth & Lickfet[114] haben die Bakterienharpune noch modifiziert.

Um bei Rollplatten den störenden Einfluß der Krümmung des Reagenzglases bei der Einstellung auszuschalten, legt man auf die unter die Linse des Mikroskops zu bringende Stelle mittels Zedernöls ein Deckglas auf. Die Abimpfung von Rollplatten geschieht mit einem winklig gebogenen Platindraht.

Das von der isolierten Plattenkolonie abgeimpfte Material wird auf das Nährmedium übertragen, das das beste Wachstum gewährleistet. Handelt es sich aber darum, die Identität der Kolonie erst festzustellen, so werden direkt aus dem Ausgangsmaterial oder von der gewonnenen Reinkultur noch Ueberimpfungen auf die verschiedensten Nährmedien vorgenommen, um aus der Art des Wachstums und dem sonstigen Verhalten zum Nährsubstrat Anhaltspunkte für die Bestimmung der Art zu gewinnen.

War die abgeimpfte Kultur nicht sicher rein, so benutzt man das abgefischte Material zunächst zu einer neuen Plattenserie.

Zur Gewinnung von Reinkulturen aus ganzen Organen und Gewebsteilen taucht Feoktistow[99] kleine Organteile 3—5 Sekunden in eine 10-proz. Alkalilösung und gibt sie dann sofort in das betreffende Nährmedium.

7. Die Betrachtung von Kulturen.

Morphologisch gleiche Arten können sich schon durch eine Verschiedenheit des Wachstums auf verschiedenen Nährmedien als different erweisen. Man achte bei Bouillonkulturen darauf, ob die Bouillon klar bleibt oder ob Niederschläge entstehen, die eventuell eine bestimmte Farbe haben. Die Niederschläge können verschiedenes Aussehen haben, bald sind sie bröckelig, bald zusammengeballt, bald schleimig, bald dünn. Beim Umschütteln veranlassen sie entweder eine gleichmäßige Trübung der Bouillon oder sie steigen in Form von Flocken auf oder als eine zusammenhängende geballte Masse. Die Bouillon kann ferner verschieden stark getrübt sein, ihre Konsistenz ändern, oberflächlich eine Haut bilden, die ihrerseits wieder ein verschiedenes Aussehen haben kann.

Sehr verschieden ist das Aussehen von Gelatinestichkulturen. Es ist bereits erwähnt, daß die Gelatine ein Eiweißkörper ist und daß verschiedene fermentbildende Bakterien imstande sind, sie zu verflüssigen, während andere sie gänzlich intakt lassen.

Bei nicht verflüssigenden Arten bildet sich bald Oberflächenwachstum allein, bald nur ein Wachstum längs des Stichkanals oder nur in dessen unteren Partien. Das Oberflächenwachstum ist bald flach, bald stark prominent (nagelförmig), bald gleichmäßig rund oder ungleichmäßig begrenzt. Die Konsistenz der Kulturmasse kann eine verschiedene sein, zäh oder weich. Der Impfstich kann zusammenhängend oder unterbrochen sein. Das Wachstum kann von der Einstichstelle in das Innere des festen Nährmediums gleichmäßig sich fortsetzen.

Bei den verflüssigenden Arten ist das Aussehen der Kulturen ein ganz verschiedenes, je nach der Schnelligkeit, mit der die Verflüssigung erfolgt. Der Verflüssigungstrichter ist bald schmäler, bald breiter und endigt spitz oder stumpf. An der Oberfläche können sich Häutchen bilden usw. Die Kulturen können eigene Farben zeigen oder das Nährsubstrat färben.

Das Kulturmaterial kann verschiedene Konsistenz besitzen. Es kann weich sein und feucht, oder trocken, schwer abhebbar und brüchig usw.

Um verschiedene Wachstumsformen einzelner Kolonien auf den gewöhnlichen festen Nährböden zu beobachten, bedient man sich am besten des Plattenverfahrens. Die Betrachtung der Kolonien geschieht zunächst mit ganz schwachen Vergrößerungen, darauf mit stärkeren. Für die Beobachtung von Kulturen in Reagenzgläsern empfiehlt sich der untenstehende kleine Apparat, der im wesentlichen aus einer Lupe besteht, die durch die Art ihrer Befestigung an dem Reagenzglas eine bequeme Betrachtung ermöglicht (Fig. 85). Man hat da auf die Größe, die Farbe, die Erhebung über die Oberfläche, die Durchsichtigkeit der Kolonie zu achten, ferner auf den Bau der ganzen Kolonie, ob sie homogen, oder ob sie granuliert ist, ob sie aus Schüppchen zusammengesetzt scheint oder aus langen Fäden usw.

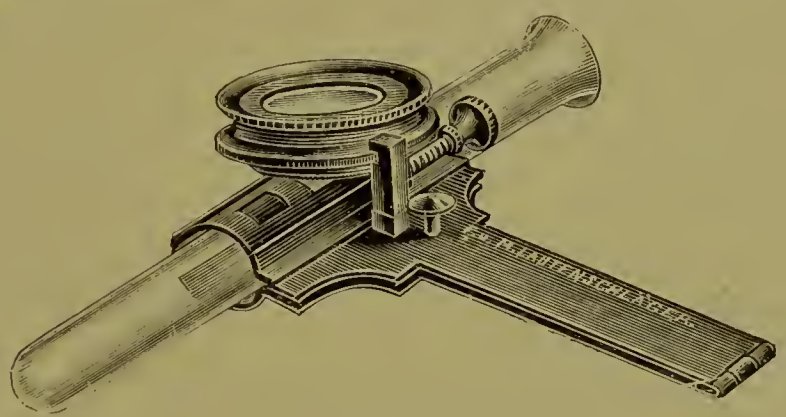


Fig. 85.

Der Rand endlich kann regelmäßig oder unregelmäßig begrenzt sein, zackig oder wellenförmig verfilzt, er kann Ausläufer besitzen, die ihrerseits wiederum verschiedenes Aussehen haben.

Auf Kartoffeln bilden sich bald dicke oder dünne, trockene oder feuchte, glatte oder runzlige Ueberzüge, bald kaum sichtbare Rasen, bald intensiv gefärbte, deutlich prominente Kolonien.

Sterilisierte Milch kann ohne Säurebildung oder mit Säurebildung fein- und grobflockig gerinnen. An die Gerinnung kann sich wieder eine Lösung des geronnenen Kaseïns anschließen oder nicht.

Noch schärfer treten Unterschiede hervor bei Verwendung der Kulturmedien, die speziell zur Differentialdiagnose dienen.

In traubenzuckerhaltigen festen Nährböden bilden sich bei gärungsfähigen Arten große Blasen im Innern, bei anderen nicht; bei säure- resp. alkalibildenden und bei reduzierenden Bakterien entstehen verschiedene Färbungen der mit betreffenden Zusätzen versehenen Nährmedien (s. unten).

Ist auf diese Weise bei pathogenen Arten, eventuell auch noch mit Zuhilfenahme des Tierversuchs, die Artbestimmung einer Reinkultur erfolgt, so wird die betreffende Art von Zeit zu Zeit auf ein neues Röhrchen mit Nährmaterial übertragen und so weiter gezüchtet. Das für die Uebertragung erforderliche Zeitintervall ist bei ver-

schiedenen Arten ein ganz verschiedenes und schwankt selbst bei sporenfreien zwischen wenigen Tagen und Monaten.

Die Reinzüchtung, bzw. die weitere Uebertragung der anaëroben Keime erfolgt, falls diese in der hohen Schicht gezüchtet, entweder indem man mit einer feinen Glaskapillare in den festen Nährboden einsticht und die Kolonie herausfischt oder in folgender Weise: Das Reagenzglas wird unter den nötigen aseptischen Kautelen zertrümmert, die so von der Glaswand befreite Agarsäule mit einem sterilen Messer in dünne Scheiben zerlegt und von den durch den Schnitt getroffenen Kolonien mit der Platinöse in der üblichen Weise weitere Uebertragungen vorgenommen.

An Stelle von Reagenzgläsern benutzt Burri[49] offene sterile Glasröhren von Reagenzglasdicke, die am unteren Ende durch einen gut schließenden sterilisierten Gummipfropf verschlossen sind. Von dem zu verimpfenden Material werden Verdünnungen unter Benutzung von Zuckeragar in der üblichen Weise in Reagenzgläsern angelegt, deren Inhalt alsdann in die Röhren gegossen und diese mit sterilem Wattepfropf verschlossen. Durch schnelles Abkühlen wird der Agar zum Erstarren gebracht. (Event. noch Ueberschichtung sterilen Agars.) Nach erfolgter Bebrütung entfernt man den Gummipfropf und läßt die Agarsäule aus der Röhre heraus auf ein Stück Filtrierpapier gleiten. Durch leichtes Anheben des Papiers bringt man den Zylinder in eine rollende Bewegung, wodurch seine Oberfläche getrocknet wird. Vom Agarzylinder werden nunmehr mit sterilem Messer Scheiben von 1—2 mm Dicke abgeschnitten, in sterile Schalen gelegt und in der oben beschriebenen Weise die Weiterimpfung vorgenommen.

Tedeschi[400] infiziert zur Uebertragung anaërober Keime sterile, mit Bouillon benetzte Glasperlen von 3 mm Durchmesser mit dem zu übertragenden Keim, bringt sie in geschmolzenen und wieder auf 42° abgekühlten Agar und legt α-, β-, γ-Röhrchen an, die er rasch zur Erstarrung bringt.

8. Konservierungsmethoden.

Um Kulturen dauernd aufzubewahren, muß man sie vor der Eintrocknung schützen, was durch einen luftdichten Abschluß zu erreichen ist. Die Kultur selbst braucht dabei vorher nicht unbedingt abgetötet zu werden, da bei Luftabschluß ohnedies das Wachstum bald sistiert. Der sicherste Abschluß wird durch Abschmelzen der Oeffnungen der Kulturgefäße erreicht (Soyka & Kràl[385]).

Czaplewski[71] wandte für Reagenzglaskulturen einen Paraffinverschluß an. Der Wattepfropf wird ein Stück weit in das Reagenzglas hineingestoßen und mit flüssigem Paraffin überschichtet, bis dieses nach dem Erstarren bis zur Mündung des Glases heranreicht. Petrischalen konservierte er auf die Weise, daß er bei umgekehrter Haltung der Schale den Zwischenraum zwischen beiden Hälften mit Paraffin ausgoß.

Sollen die Kulturen vor der Konservierung abgetötet werden, so erhalten sie zunächst einen Formalinzusatz (Hauser[156]). Schalenkulturen werden zu dem Zweck auf der Innenseite des Deckels mit Filtrierpapier ausgekleidet, das mit einer Formalinlösung betupft wird. Sie kommen dann in eine feuchte Kammer zu stehen, in der sich in

einem offenen Schälchen mit Formalin getränkte Watte befindet. Bei Reagenzglaskulturen wird das untere Ende des Wattepfropfs in Formalin getaucht und derartige Kulturen werden dann bis zur erfolgten Abtötung in ein luftdicht zu verschließendes zylindrisches Glas eingestellt, auf dessen Boden sich gleichfalls mit Formalin getränkte Watte befindet. Das Formalin härtet die Gelatine, ändert aber im übrigen weder das Aussehen der Kultur noch des Substrats. Um wirkliche Dauerkulturen zu erhalten, ist jedoch auch bei abgetöteten Kulturen ein luftdichter Abschluß, wie er bei Reagenzglaskulturen durch Abschmelzung erzeugt wird, zur Verhütung der Eintrocknung nötig. Um dies auch für Petrischalen sicher zu erreichen, hat Paul [301] ein besonderes Verfahren angegeben. Er schließt die kulturtragenden Petrischalen nicht mit einem Deckel, sondern mit einer Glasplatte, die eine für die Schale passende tiefe Rinne hat. Die Abdichtung erfolgt durch geschmolzenen weißen Siegellack.

Zur Konservierung einzelner Kolonien in Form des mikroskopischen Präparates trocknete Garrè [132] ausgeschnittene Gelatinekolonien auf dem Objektträger und konservierte sie in Glyzeringelatine unter Deckglas. Aehnliche Verfahren rühren von Plaut [319], Lipez [243], Jacobi [183] und Günther [142] her.

Auch von mit Formalin abgetöteten Platten lassen sich Präparate einzelner Kolonien auf Objektträgern herstellen. Der Einschluß erfolgt in verflüssigter Gelatine unter Deckglas. Zum Erstarren der Einschlußmasse werden die Präparate 24 Stunden Formalindämpfen ausgesetzt; Lackring zum Schutz gegen Eintrocknung.

Um den feineren Bau von Kolonien zu studieren, muß man das Substrat härten und färben. Jacobi übergießt zu dem Zweck Platten mit 1-proz. Lösung von Kaliumbichromat, läßt sie 1—3 Tage an der Luft stehen und löst sie nach Entfernung des Kaliumbichromats von der Unterlage. Nach 24-stündigem Auswaschen in Wasser und Härtung in Alkohol werden ausgeschnittene Stücke gefärbt. Einschluß in Kanadabalsam.

A. Neisser [280] hat Schnitte mit dem Mikrotom aus den in analoger Weise vorbereiteten Gelatinestichkulturzylindern angefertigt und gefärbt.

Winkler [431] hat Schnitte durch lebende Agarkulturen angelegt. Er verfertigte sich aus Paraffinblöcken Hohlzylinder, die unten mit Paraffin verschlossen wurden und goß sie mit Agar aus, der eventuell schon vorher infiziert war oder nachträglich durch eine Stichkultur geimpft wurde. Bei einem gewissen Grad des Wachstums wurden mit dem Mikrotom Schnitte unter Alkohol durch die Kultur angelegt.

Literatur zum III. Kapitel.

1. Abba, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 23, 1898.
2. Abe, Nakao, ebd., Bd. 44, Heft 7, 1907.
3. Anzilotti, ebd., Bd. 40, Heft 5, 1906.
4. Arens, ebd., Bd. 15, 1894.
5. Babes, ebd., Bd. 4, 1888.
6. — ebd., Bd. 59, Heft 5—7, 1911.
7. Babucke, ebd., Bd. 40, Heft 4, 1906.
8. Baisch, C., 13. Vers. d. deutsch. Ges. f. Geburtsh. u. Gynäkol., Straßburg 1909.
9. Barsiekow, Wien. klin. Rundsch., 1902, Nr. 44.
10. Baumann, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 25.
11. Baumann & Rimpau, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 47, Heft 1, 1908.

12. Beck, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 22, 1897.
13. Beijerinck, ebd., Bd. 9, 1891.
14. — ebd., II. Abt., Bd. 3, 1897.
15. — ebd., ref. I. Abt., Bd. 7, 1890.
16. — II. Abt., Bd. 6, 1900.
17. Berner, O., ebd., Bd. 37, Heft 3, 1904.
18. Bernstein, ebd., Bd. 50, Heft 1, 1909.
19. Bernstein, E. P. & Epstein, A. A., Journ. of inf. dis., Vol. 3, 1906.
20. Besser, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 41, Heft 2, 1906.
21. Biffi, U., ebd., Bd. 44, Heft 3, 1909.
22. — Ann. d'igiene sperim., Vol. 13, Fasc. 4.
23. — Boll. delle sc. med., avril 1907.
24. Bisserie, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1907, Nr. 3.
25. Bitter, Centralbl. f. Bakt., Bd. 59, Heft 4, 1911.
26. Blücher, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 8, 1890.
27. Bohne, ebd., Bd. 61, Heft 2, 1908.
28. Boit, H., Einfache u. sichere Identifizierung d. Typhusbac., Jena (G. Fischer) 1905.
29. Bolton, Med. News, Vol. 1, 1887.
30. Bondy, Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol., Bd. 29, Heft 5.
31. Bordet, 77. Jahresvers. d. Brit. med. assoc., Juli 1909.
32. Bordet & Gengou, Ann. de l'inst. Pasteur, 1906.
33. Bosse, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, H. 6, 1903.
34. Botkin, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 9, 1890.
35. Boxer, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, Heft 4, 1906.
36. Braatz, ebd., I. Abt., Bd. 8, 1890.
37. Brefeld, Botanische Unters. über Schimmelpilze, Bd. 1, 1872.
38. Brongersma & van de Velde, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, Heft 4, 1903.
39. Bronstein J. & Grünblatt, G. N., ebd., I. Abt., Orig., Bd. 32, Nr. 6, 1902.
40. Brudny, ebd., Bd. 57, Heft 5, 1911.
41. Bruschettini, A., Ann. dell' ist. Maragliano, 1907, fasc. 1.
42. Bruschettini & Ansaldo, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 6, 1907.
43. — — Gazzetta degli osped., Vol. 72, 1907.
44. Bruynoghe, Centralbl. f. Bakt., Bd. 56, Heft 1, 1910.
45. Buchholz, W., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 56, Heft 2, 1907.
46. Buchner, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 4, 1888.
47. Buerger, Leo, ebd., Bd. 39, Heft 1, 1905.
48. Bumm, Deutsche med. Woch., 1885, u. Monographie Wiesbaden, Bergmann, 1887.
49. Burri, R., Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 8.
50. — Das Tuscheverfahren, Jena (G. Fischer) 1909.
51. Busson, Centralbl. f. Bakt., Bd. 58, Heft 5, 1911.
52. Cache, A., ebd., Bd. 40, Heft 2, 1906.
53. Calandra, ebd., Bd. 54, Heft 6, 1910.
54. Calderini, A., ebd., Bd. 51, Heft 6, 1909.
55. Cantani, ebd., I. Abt., Bd. 22, 1897, u. Bd. 53, Heft 4, 1910.
56. Capaldi, ebd., I. Abt., Bd. 20, 1896.
57. Caulfeild, ebd., Bd. 49, Heft 3, 1909.
58. Chatterjee, Lancet, 19. Okt. 1907.
59. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 48, Heft 2, 1909.
60. Clauditz, Hyg. Rundsch., Bd. 14, Nr. 15, 1904.
61. Cohn, J., Beitr. zur Biol. der Pflanzen, 1872.
62. Conradi, H., Centralbl. f. Bakt., Bd. 56, Heft 3 u. 4, 1910.
63. — Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 1.
64. — Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 34.
65. — ebd., 1906, Nr. 49.
66. — Deutsche med. Wochenschr., 1908, Nr. 28.
67. — Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 29.
68. Crendiropoulo, M., Centralbl. f. Bakt., Bd. 55, Heft 3, 1910.
69. Crendiropoulo, M. & Panayotatou, ebd., Bd. 55, Heft 3, 1910.
70. Cutolo, A., Boll. d. soc. dei natural. in Napoli, Anno 16, ser. 1, Vol. 16.
71. Czaplewski, Centralbl. f. Bakt., Bd. 6, 1889.
72. Dahmen, ebd., I. Abt., Bd. 12, 1892.
73. le Dantec, C. r. soc. biol., 1907 u. 1908.
74. Debrand, L., Ann. Pasteur, 1902.
75. Delius & Kolle, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 24, 1897.
76. Dietrich, Centralbl. f. Bakt., Bd. 53, Heft 5, 1910.
77. Dieudonné, ebd., Bd. 50, Heft 1, 1909.
78. — Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol., München, 2. März 1909.

79. Doebert, Arch. f. Hyg., Bd. 59, Heft 4, 1906.
80. Doepner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, Heft 5, 1909.
80a. Doerr, Wien. med. Wochenschr., 1909, Beil. Militärarzt, S. 273.
81. Dominikiewicz, ebd., Bd. 47, Heft 5, 1908.
82. Dreuw, ebd., I. Abt., Orig., Bd. 36, Nr. 5, 1904.
83. v. Drigalski, ebd., Bd. 41, Heft 2, 1906.
84. v. Drigalski-Conradi, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 39, 1902.
85. Drossbach, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 13, 1893.
86. Dworetzky, ebd., Bd. 37, Heft 4, 1904.
87. Elschnig, Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 26.
88. — Verein der Aerzte in Prag, 16. Febr. 1910.
89. Elsner, Hyg. Rundsch., 1894.
90. Emmerling, Hyg. Rundsch., Bd. 14, Nr. 10, 1904.
90a. Endo, S., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 35, 1904.
91. Epstein, St., ebd., Bd. 24, 1898.
92. — ebd., Bd. 28, 1900.
93. — ebd., Bd. 31, 1902.
94. Esch, ebd., Bd. 52, Heft 1, 1909.
95. — Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 12.
96. v. Esmarch, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 1, 1886.
97. — Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 1, 1887.
98. Fehrs & Sachs-Müke, ebd., Bd. 48, Heft 1, 1909.
99. Feoktistow, A., ebd., Bd. 51, Heft 6, 1909.
100. Fermi & Bassu, ebd., Bd. 35, Heft 5, 1904.
101. — — ebd., Bd. 38, Heft 2, 1905.
102. — — ebd., Bd. 38, Heft 3 u. 4, 1905.
103. Fichtner, Med. Gesellsch., Leipzig, 6. Juni 1905.
104. Ficker, Centralbl. f. Bakt., Bd. 27, 1900.
105. Fischer, B., Unters. d. Planktonexp., Leipzig u. Kiel 1894.
106. Fornet, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 22.
107. Forster, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 22, 1897.
108. Fränkel, A., Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 10, 1886.
109. Fränkel, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 3, 1888.
110. — Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 5, 1889.
111. Fränkel, C., Hyg. Rundsch., Bd. 4, 1894.
112. — ebd., Bd. 5, 1895.
113. Freymuth, F., Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol., 1907.
114. Freymuth & Lickfet, Deutsche med. Wochenschr., 1893.
115. Friedberger & Reiter, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, H. 5, 1911.
116. Fromme, Inaug.-Diss. Marburg, 1891.
117. Fromme, F., Centralbl. f. Gynäkol., Bd. 61, Nr. 35, Heft 3, 1907.
118. Fromme, F. & Heynemann, Th., Berl. klin. Wochenschr., 1908, Nr. 19.
119. Fürth, Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, Heft 1, 1908.
120. Frugoni, ebd., Bd. 53, Heft 5, 1910.
121. Furntratt, ebd., Bd. 39, Heft 4, 1905.
122. Gabritschewski, G., ebd., Bd. 10, 1891.
123. — ebd., I. Abt., Orig., Bd. 31, Nr. 15, 1902.
124. — ebd., I. Abt., Orig., Bd. 31, Nr. 16, 1902.
125. Gaehtgens, W., Diss. Straßburg i. E., 1904.
126. — Arch. f. Hyg., Bd. 52, Heft 3, 1905.
127. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, Heft 5, 1905.
128. Gaehtgens & Bruckner, ebd., Bd. 53, Heft 5, 1910.
129. Gaehtgens & Kamm, Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 26.
130. Gaffky, Mitt. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 1, 1881.
131. Galimard & Lacomme, Ref. Hyg. Rundsch., 1908.
132. Garré, Fortschr. d. Med., 1886.
133. Gasperi & Savini, Centralbl. f. Bakt., Bd. 58, Heft 3, 1911.
134. Gildemeister, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt., Bd. 33, Heft 3, 1910.
135. Gins, Centralbl. f. Bakt., Bd. 52, Heft 5, 1909.
136. Glage, F., ebd., I. Abt., Orig., Bd. 33, Nr. 6, 1903.
137. Glaser & Hachla, ebd., Bd. 57, Heft 4, 1911.
138. Globig, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 3, 1887.
139. Gordon, Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, Heft 5, 1904.
140. Gracowski, St. & Nestor, N., Spital, 1906, Nr. 5.
141. Gruber, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 1, 1887.
142. Günther, Deutsche med. Wochenschr., 1889.
143. Guth, F., Centralbl. f. Bakt., Bd. 51, Heft 2, 1909.

144. Hachla & Holobut, Centralbl. f. Bakt., Bd. 52, Heft 2, 1909.
145. Haegeler, ebd., I. Abt., Bd. 17, 1895.
146. Hagemann, Hyg. Rundsch., Bd. 14, Nr. 13, 1904.
147. Hammerl, Centralbl. f. Bakt., Bd. 30, S. 658, 1901.
148. — ebd., Bd. 31, Nr. 12, 1902.
149. Hammerschmidt, ebd., Bd. 40, Heft 5, 1906.
150. Hanna, Journ. pathol. and bacteriol., Vol. 5.
151. Harras, P., Münch. med. Woehensehr., 1906, Nr. 46.
152. Harrison & Vanderbeck, Centralbl. f. Bakt., Bd. 51, Heft 5, 1909.
153. Hart, Carl, ebd., Bd. 50. Heft 4, 1909.
154. Hata, S., ebd., Bd. 46, Heft 6, 1908.
155. Hauser, Ueber Fäulnisbakterien, 1885.
156. Hauser, Münch. med. Wochensehr., 1893.
157. Heim, Lehrb. 1911.
158. — Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 30, Nr. 15, 1901.
159. — ebd., Bd. 53, Heft 5, 1910.
160. — ebd., Bd. 55, Heft 5, 1910.
161. — Deutsehe med. Woehensehr., 1907.
162. Heinemann, P. G., Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Ref., Bd. 40, Nr. 11, 12, 1907.
163. Heller, Berl. klin. Wochenschr., 1890.
164. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, Heft 1, 1905.
165. — 3. Tagung der fr. Vereinigung f. Mikrobiol. im Juni 1909.
166. Hesse, R. & W., Deutsehe med. Wochenschr., 1885.
167. Hesse, Zeitsehr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 11, 1892.
168. — ebd., Bd. 15, 1893.
169. — ebd., Bd. 31, 1899.
170. — ebd., Bd. 46, 1904.
171. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, Heft 1, 1908.
172. Hetsch, H., ebd., I. Abt., Orig., Bd. 34, Nr. 6, 1903.
173. v. Hibler, Untersueh. über die pathogenen Anaëroben, Jena, G. Fiseher, 1910.
174. Hildebrandt, Hyg. Rundsch., Bd. 12, 1902.
175. Hilgermann, R., Klin. Jahrbuch, Bd. 19, Heft 3, 1908.
176. Hirschbruch & Schwer, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 34, Nr. 6, 1903; Bd. 36, Nr. 1, 1904.
177. Hoerder, C., Münch. med. Wochensehr., 1909, Nr. 27.
178. van't Hoff, J. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 30, 1901.
179. Holten, ebd., Bd. 13, 1893.
180. Hörnig, Med. Gesellsch. Leipzig, 14. Januar 1908.
181. Hueppe, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 4, 1888.
182. Huntermüller, ebd., Bd. 50, Heft 1, 1909.
183. Jacobi, ebd., Bd. 3, 1888.
184. Jokott, ebd., I. Abt., Bd. 25, 1899.
185. Jorns, Hyg. Rundseh., 1904, Nr. 15.
186. Jurewitsch, W., Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, Heft 5, 1908.
187. Kalberlah, F., Berl. klin. Wochensehr., 1905, Nr. 48.
188. Kamen, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.
189. Kanthack & Stephens, ebd., Bd. 19, 1896.
190. Karlinski, Hyg. Rundsch., 1895.
191. Kaspareck, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 32, Nr. 5, 1902.
192. Kathe, H. ebd., Bd. 55, Heft 5, 1910.
193. Kathe & Blasius, ebd., Bd. 52, Heft 5, 1909.
194. Kaufmann, ebd., Bd. 10, 1891.
195. Kayser, H., ebd., Bd. 42, Heft 2, 1906.
196. — Münch. med. Woehensehr., 1906, Nr. 17.
197. — ebd., 1906, Nr. 40.
198. — ebd., 1907, Nr. 22.
199. Kedrowski, Zeitsehr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 20, 1895.
200. — ebd., Bd. 37, 1902.
201. Kier-Petersen & Kirstinn Björnsen, Dansk Klinik, 1909.
201a. Kiefer, Berl. klin. Wochensehr., 1895, Nr. 15.
202. Kindborg, Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, Heft 6, 1908.
203. Kiralyfi, Gezar, ebd., Bd. 42, Heft 3 u. 4, 1906.
204. Kirchner, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 8, 1890.
205. Kirstein, Centralbl. f. Bakt., Bd. 59, Heft 4, 1911.
206. — Deutsehe med. Woehensehr., 1909, Nr. 51.
207. Kitasato. Zeitsehr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 7, 1889.
208. Kitasato & Weyl, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 8, 1890.

209. Kitt, Th., Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, Heft 6, 1909.
210. Klebs, Arch. f. exp. Pathol., 1873.
211. Klein, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 24, 1898.
212. Klimenko, ebd., Bd. 46, 48, 50, 1908—1909.
213. Klinger, Inaug.-Diss. Straßburg, 1904.
214. Klopstock, Berl. klin. Wochenschr., 1902, Nr. 34.
215. Koch, R., Mitt. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 1, 1881.
216. — ebd., Bd. 2, 1884.
217. — Deutsche med. Wochenschr., 1885.
218. Koch, W., 37. Vers. d. deutsch. Gesellsch. f. Chir., 1908.
219. Komma, F., Centralbl. f. Bakt., Bd. 55, Heft 1, 1910.
220. Körber, B., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 16, 1894.
221. Krause, Fr., Arch. f. Hyg., Bd. 34, H. 1, 1902.
222. Král, Verh. d. deutsch. dermatol. Ges., 1889.
223. — Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1889.
224. Kruse, ebd., Bd. 15, 1894.
225. Kulka, ebd., Bd. 59, Heft 5—7, 1911.
226. Kuntze, ebd., Bd. 44, 1907.
227. Kürsteiner, J., ebd., II. Abt., Bd. 19, 1907.
228. Küster, ebd., I. Abt., Bd. 40, Heft 2, 1906.
229. — ebd., Bd. 50, Heft 4, 1909.
230. Kutscher, K., ebd., Bd. 45, Heft 3, 1908.
231. Laboschin, J., Studien über die Verwendbarkeit eines neuen Eiweißkörpers f. bakteriol. Kulturzwecke, Inaug.-Diss. Freiburg, Schweiz, 1898.
232. Lagerheim, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 11, 1892.
233. Langstein & Mayer, ebd., Bd. 35, Nr. 2, 1904.
234. Latzel, Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 30.
235. Laubenheimer, Centralbl. f. Bakt., Bd. 52, Heft 2, 1909.
236. Lentz, O., ebd., Bd. 53, Heft 3, 1910.
237. Lentz & Tietz, Münch. med. Wochenschr., 1903, Nr. 49.
238. — — Klin. Jahrbuch, 1905.
239. Leuriaux & Geets, Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, Heft 6, 1906.
240. Liborius, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 1, 1886.
241. Liefmann, Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 17.
242. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, Heft 4, 1908.
243. Liepez, ebd., I. Abt., Bd. 1, 1887.
244. Lipschütz, ebd., I. Abt., Orig., Bd. 36, Nr. 5, 1904.
245. Lister, Transact. of the pathol. soc., London, Vol. 29, 1878.
246. Loeffler, Mitt. a. d. Kais. Ges.-Amt., Bd. 2, 1884.
247. — Deutsche med. Wochenschr., 1903, Nr. 36.
248. — ebd., 1906, Nr. 8.
249. — ebd., 1907, Nr. 39.
250. Loeffler, F., Walter, S., Dibbelt, S. & Wehrlin, J., ebd., 1909, Nr. 30.
251. Loening, F., Münch. med. Wochenschr., 1910, Heft 4.
252. Lubenau, C., Arch. f. Hyg., Bd. 61, Heft 3, 1907.
253. — Hygien. Rundsch., Jahrg. 17, 1907.
254. Lüdke & Polauv, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 1.
255. Maassen, Mitt. a. d. Kais. Ges.-Amt., Bd. 9, 1894.
256. Mandelbaum, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 48.
257. Mandelbaum & Heinemann, Centralbl. f. Bakt., Bd. 53, Heft 3, 1910.
258. Marino, F., Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 21, Nr. 12, 1907.
259. Marpmann, Zeitschr. f. angew. Mikrosk., Bd. 13, 1907.
260. — ebd., Bd. 15, Heft 1, 1909.
261. Marschall, Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, Heft 3, 1905.
262. Marx, E., Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 7.
263. Marzinowsky, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 62, Heft 3, 1909.
264. Mayer, O., Centralbl. f. Bakt., Bd. 56, Heft 5 u. 6, 1910.
265. Megele, ebd., Bd. 52, Heft 5, 1909.
266. Mereschkowsky, ebd., Bd. 33, Heft 5, 1903.
267. — ebd., I. Abt., Orig., Bd. 33, Nr. 5, 1903.
268. Meyer, F., Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 63, Heft 6.
269. Meyerstein, W., Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 5, 1907.
270. — Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 38.
271. — ebd., 1906, Nr. 44.
272. Meyerstein, W. & Rosenthal, B., ebd., 1904, Nr. 27.
273. Morris, Arch. f. Hyg., 1897.
274. Mühlens, Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 29.

275. Mühlens, P., Centralbl. f. Bakt., Bd. 48, Heft 4, 1909.
276. Mühlens, P. & Löhe, ebd., Bd. 47, Heft 4, 1908.
277. Müller, Reiner, Physiol. Verein in Kiel, 8. Febr. 1909.
278. Müller & Gräf, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 2.
279 Nägeli, Unters. über niedere Pilze, München u. Leipzig, 1882.
280. Neisser, A., Centralbl. f. Bakt., Bd. 3, 1888.
281. Neisser, zit. nach Marx, Diagnostik, Serumtherapie u. Prophylaxe der Infektionskrankh., Berlin 1902.
282. Neufeld-Woithe, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 33, Heft 3, 1910.
283. Neumann, G., Arch. f. Hyg., Bd. 59, Heft 2, 1906.
284. — ebd., Bd. 60, Heft 1, 1907.
285. Nieter, Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 17.
286. Nikiforoff, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 8, 1890.
287. Noguchi, Münch. med. Wochenschr., 1911, Nr. 29.
288. Novy, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 16, 1894.
289. Nowack, Arch. f. Hyg., Bd. 53, Heft 4, 1905.
290. — ebd., Bd. 54, 1905.
291. Nuttall, H. F., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 18, 1895.
292. Oldekop, ebd., Bd. 35, 1904.
293. Omelianski, ebd., II. Abt., Bd. 8, Heft 22, 1902.
294. — ebd., I. Abt., Bd. 34, Heft 1, 1903.
295. Ottolenghi, ebd., I. Abt., Bd. 58, Heft 4, 1911.
296. Padlewsky, ebd., Bd. 47, Heft 4, 1908.
297. — Russky Wratsch, 1908, Nr. 12.
298. Pasteur, Compt. rend., T. 45, 1857.
299. — ebd., T. 45, 1861.
300. Paul, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 16, 1894.
301. Paul, Th., ebd., Bd. 29, 1901.
302. — Münch. med. Wochenschr., 1901.
303. Peabody & Pratt, Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, Heft 6, 1908.
304. Pende & Viviani, L., ebd. Bd. 44, Heft 3, 1907.
305. Peré, Ann. Pasteur, 1882.
306. Permin, Centralbl. f. Bakt., Bd. 57, Heft 6, 1911.
307. Pergola, M., ebd., Bd. 54, Heft 5, 1910.
308. — ebd., Bd. 59, Heft 1, 1911.
309. Petri, ebd., I. Abt., Bd. 1, 1887.
310. Petri & Maassen, Mitt. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 8, 1893.
311. Petruschky, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1889.
312. Pfeiffer, R., Deutsche med. Wochenschr., 1892.
313. — Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 13, 1893.
314. Pfuhl, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 4, 1907.
315. Pies, Arch. f. Hyg., Bd. 62, Heft 2, 1907.
316. Piorkowski, Berl. med. Gesellsch., Sitz. v. 25. Jan. 1899.
317. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, Heft 4, 1906.
318. — Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 14.
319. Plaut, Fortschr. Med., 1886.
320. Poppe, Kurt, Centralbl. f. Bakt., Bd. 55, Heft 6, 1910.
321. Poppe, ebd., Bd. 58, Heft 5, 1911.
322. dal Pozzo, Med. Jahrbücher, 1887.
323. Prausnitz, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 9, 1891.
324. — Berl. klin. Wochenschr., 1905, Nr. 19.
325. — Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 48.
326. Prosskauer & Beck, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 18, 1894.
327. Raskin, M., Petersb. med. Wochenschr., 1887.
328. Reischauer, Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, Heft 1, 1905.
329. Remy, L., Ann. de l'inst. Pasteur, 1901.
330. Reuschel, F., Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 25.
331. Rille, Med. Gesellsch. Leipzig, 11. Juli 1905.
332. Rivas, D., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 32, Nr. 11, 1902.
333. Roberts, Philosophic. transact. of the r. soc., 1874.
334. Rolly, Med. Ges. Leipzig, 7. Mai 1907.
335. Rosam, K., Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 12, Heft 11/16, 1904.
336. Rosenberger-Philadelphia, Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, Heft 3, 1909.
337. Rosenhauer, Biol. Abt. d. ärztl. Vereins Hamburg, 6. Juli 1909.
338. Rosenthal & Schultz, Biol. Centralbl., Bd. 8, 1888.
339. Rosen-Runge, Biol. Abt. d. ärztl. Vereins zu Hamburg, 18. Dez. 1906.
340. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 43, Heft 5, 1907.

341. Roth, Hyg. Rundschau, Bd. 13, Nr. 10.
342. Roth, Ficker, Hoffmann, Arch. f. Hyg., Bd. 49.
342a. Rothberger, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 24, 1898.
343. Rothe, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 6, 1907.
344. — ebd., Bd. 46, Heft 7, 1908.
345. Roux, Ann. Pasteur, T. 1, 1887.
346. — ebd., T. 2, 1888.
347. Ruzicka, St., Arch. f. Hyg., Bd. 58, Heft 4, 1906.
348. Sachs, E., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 63, Heft 3, 1909.
349. Sachs-Müke, Klin. Jahrb., Bd. 21, Heft 2, 1909.
350. Sakharoff, Ann. Pasteur, T. 6, 1892.
351. Salomon, E., Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, Heft 1, 1908.
352. Salomonsen, Botan. Zeitung, 1876 u. 1880.
353. — Techn. élém. de Bact. (a. d. Dänischen übersetzt v. Durand-Fardell), Paris 1891.
354. Sanfelice, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 14, 1893.
355. Sangiorgi, Pathologica, Vol. 2, No. 34, 1910.
356. Schenk, Allg. Wien. med. Ztg., 1887.
357. Schereschewsky, J., Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, Heft 1, 1908.
358. — Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 19.
359. — ebd., 1909, Nr. 29.
360. — ebd., 1909, Nr. 38.
361. Schill, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 5, 1899.
362. Schindler, H., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 63, 1909.
363. Scholtz, ebd., Bd. 27, 1889.
364. Schottelius, E., Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 42.
365. Schottmüller, ebd., 1903, p. 849.
366. Schouten, Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 30, 1901.
367. — Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., Bd. 22, H. 1, S. 10.
368. Schröder, Cohns Beiträge, Bd. 1, 1872.
369. Schüffner, Münch. med. Woehenschr., 1907, Nr. 35.
370. Schultze, W., ebd., 1907, Nr. 24.
371. Schumacher, Klin. Jahrb., Bd. 21, Heft 2, 1909.
372. — Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 54, Heft 1, 1906.
373. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, Heft 6 u. 7, 1906.
374. Seemann, Berl. klin. Wochenschr., 1909, Nr. 14.
375. Segin, Centralbl. f. Bakt., Bd. 34, H. 3, 1903.
376. Sellards, ebd., Bd. 37, H. 4, 1904.
377. Serkowski, ebd., Bd. 37, H. 4, 1904.
378. Seiffert, Münch. med. Wochensehr., 1909, Nr. 3.
379. Shaw, E., Zeitschr. f. anal. Chem., 44. Jahrg.
380. Simmonds, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 21, 1897.
381. Sineff & Drostowitsch. ebd., Bd. 52, Heft 3, 1909.
382. Slupski, ebd., I. Abt., Bd. 30, 1901.
383. Smith, ebd., Bd. 18, 1895.
384. Soyka, Deutsche med. Woehenschr., 1888.
385. Soyka & Král, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 4, 1888.
386. Sparmberg, F. & Amako, Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, Heft 1, 1909.
387. Spengler, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 42, 1903, u. Bd. 51, 1905.
388. Spronck, Ann. Pasteur, 1895.
389. Stamm, Centralbl. f. Bakt., Bd. 42, Heft 7, 1906.
390. Sterling, ebd., II. Abt., Bd. 1, 1895.
391. — ebd., Bd. 38, Heft 4, 1905.
392. Stokvis, S. C., Nederl. tijdschr. v. geneesk., 1910, Nr. 1.
393. Stolpp, Centralbl. f. Bakt., Bd. 58, Heft 3, 1911.
394. Streng, O., ebd., Orig., Bd. 34, Nr. 6, 1903.
395. Stüler, A., ebd., Bd. 37, Heft 2, 1904.
396. Stutzer & Burri, ebd., II. Abt., Bd. I, 1895.
397. v. Szaboky, J., ebd., I. Abt., Orig., Bd. 43, 1907.
398. Tarchanoff & Kolessnikoff, Ref. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., Bd. 4, 1887.
399. Tarozzi, Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, Heft 5, 1905.
400. Tedeschi, A., ebd., Bd. 54, Heft 2, 1910.
401. Thalmann, ebd., Bd. 27, 1900, Bd. 31, 1902.
402. Thalmann, ebd., Bd. 54, Heft 1, 1910.
403. Trapani, Gaz. d. osped. e. d. clin., 1905, Nr. 58. Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 37, 1905.
404. Trenkmann, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 23, 1898.

405. Turro, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 17, 1895.
406. — ebd., Bd. 31, Nr. 4, 1902.
407. Tuschinsky, M., ebd., Bd. 54, Heft 1, 1910.
408. Uhlenhuth & Xylander, Berl. klin. Woehenschr., 1908, Nr. 8.
409. Unna, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 9, 1891.
410. — ebd., Bd. 11, 1892.
411. Uschinsky, ebd., Bd. 14. 1893.
412. Uyeda, Bull. of the imp. centr. agr. exp. stat. Japan, Vol. 1, 59, 1906. Ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref. Bd. 39, 1907.
413. Vannod, Th., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 40, Heft 1, 1906.
414. — ebd., Bd. 44, Heft 1, 1907.
415. — ebd., Bd. 44, Heft 2, 1907.
416. Vay, F., ebd , Bd. 55, Heft 3, 1910.
417. Vial, F., Hyg. Rundseh., Jahrg. 17, 1907.
418. Volpino & Fontana, Centralbl. f. Bakt., Bd. 42, Heft 7, 1906.
419. Vourloud, ebd., Bd. 40, Heft 5, 1900.
420. Walz, Münch. med. Woehensehr., 1900.
421. Wassermann, Berl. med. Wochenschr., 1897.
422. — Zeitsehr. f. Hyg., Bd. 27, 1898.
423. Weleminsky, Wissenseh. Gesellsch. deutseh. Aerzte in Böhmen, 1906.
424. — Centralbl. f. Bakt., Bd. 42, Heft 3, 1906.
425. — ebd., Bd. 42, Heft 4, 1906.
426. Mc Weenie, 77. Brit. med. assoc., 1909.
427. Werbitzki, Arch. f. Hyg., Bd. 69, 1909.
427a. Wertheim, Areh. f. Gynäkol., Bd. 42.
427b. — Deutsche med. Woehensehr., 1891, Nr. 50.
428. Wesener, Hyg. Rundsch., Bd. 4, 1894.
429. Wiens, Münch. med. Wochensehr., 1907, Nr. 32.
430. — ebd., Nr. 19, 1909.
431. Winkler, Fortschr. d. Med., Bd. 11.
432. Wolff, M., Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, Heft 7, 1908.
433. Wolff-Eisner, A., ebd., Bd. 49, Heft 5, 1909.
434. Wright, ebt., I. Abt., Bd. 27, 1900.
435. Wrzosek, ebd., Bd. 43, Heft 1, 1907.
436. — ebd., Bd. 44, Heft 6, 1907.
437. — Wien. klin. Woehenschr., 1904, Nr. 48.
438. — Müneh. med. Wochensehr., 1906, Nr. 51.
439. Zeidler, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 5, 1907.
440. Zettnow, ebd., I. Abt., Bd. 15, 1894.
441. Zielleczky, R., ebd., Bd. 32, Nr. 10, 1902.
442. Zinno, A., Riforma med., Roma, Anno 17, Vol. 4, Nr. 64, 759.
443. Zörkendörfer, Areh. f. Hyg., Bd. 16, 1893.
444. Zupnik, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 24, 1898.

IV. Kapitel.

Methoden des Nachweises der Bakterien im Körper, in Luft, Boden und Wasser.

A. Methoden des Nachweises der Bakterien im Körper.

Die Entnahme der zu untersuchenden Körperflüssigkeiten, Sekrete, Exkrete, Eiter etc., hat nach Möglichkeit aseptisch zu erfolgen, auch darf das Untersuchungsmaterial zunächst nicht mit Antisepticis in Berührung kommen.

1) Untersuchung von Blut. Kleinere Blutmengen gewinnt man aus dem Ohrläppchen oder der Fingerstreckseite (besser als Fingerbeere). Die Haut wird an dieser Stelle mit Alkohol und Aether

gesäubert und vollkommen trocknen gelassen. Man sticht dann mit einer sterilen Nadel oder Lancette (Fig. 86) ein oder bedient sich hierzu der FRANKEschen Nadel (Fig. 87), des SCHOTTELIUSschen[95] Hämostix (Fig. 88) oder einer feinen eben ausgezogenen, daher sterilen Glasnadel nach WRIGHT. — Erfolgt die Blutentnahme aus dem Finger, so umwickelt man diesen, vom proximalen Ende beginnend, mit einer Binde oder einem kleinen dünnen Gummischlauch in der Weise, daß eine leichte Stauung der Venen eintritt. — (Vergleiche auch die im Kap. III beschriebene Blutentnahme nach SCHOTTELIUS zur Herstellung von Blutnährböden.)

Fig. 86.

Fig. 87.

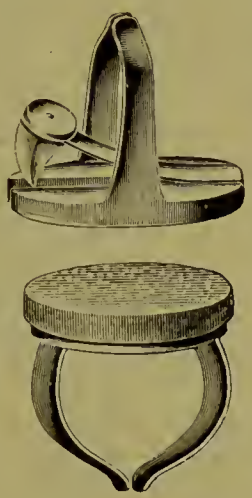


Fig. 88.

a b c

Fig. 89.

Das Aufsaugen des Blutes erfolgt in sterilen Röhrchen [mit Wattebausch nach CZAPLEWSKI[8] (Fig. 89a), nachher zentrifugieren], oder in U-Röhrchen nach NEISSER (Fig. 89b). Der Vorteil der U-Röhrchen nach NEISSER besteht darin, daß man nach dem Zentrifugieren mit einer Feile die serumhaltigen Teile der beiden Schenkel abschneiden und den Inhalt direkt in eine Meßpipette einfließen lassen kann.

Man kann auch Kapillaren, deren Enden vorher abgebrochen worden oder Glaskapseln, die an beiden Enden in Kapillaren ausgezogen sind, benutzen (Fig. 89c).

Die Herstellung dieser geschieht in der folgenden Weise nach WRIGHT (zitiert nach REITER[83]): Man schneidet sich mit dem Glasmesser etwa 40 cm lange Glasröhren von 4 mm Durchmesser, erhitzt unter Rotieren in der Spitze der Bunsenflamme eine Stelle, die etwa 3 cm vom rechten Ende entfernt ist, bis zur Rotglut und Weichwerden des Glases, nimmt die erhitzte Glasröhre aus der Flamme und zieht diese außerhalb der Flamme in mäßig raschem Tempo aus. Einige Sekunden hält man die ausgezogene Röhre gespannt, damit das Glas in gerader Linie erkaltet, und trennt dann an der dünnsten Auszugsstelle die beiden Teile durch kurzes Erhitzen und Ausziehen in der Flamme. — Das rechte Ende kann man eventuell als Pipette verwenden, der linke erhaltene Teil wird weiter zur Kapsel verarbeitet; die Stelle der Röhre, an der die Verdickung endet, wird bis zur Rotglut erhitzt, wieder ausgezogen und das rechte Ende am Schluß des Ausziehens kurz nach unten vorn umgebogen, so daß ein spitzer

Winkel entsteht. In der Bunsenflamme wird die so erhaltene Kapsel in der schon beschriebenen Weise von dem übrigen linken Teil der Röhre getrennt. Rechts ist die fertige Kapsel, links bleibt eine spitz ausgezogene Glasröhre, wie sie eben verarbeitet wurde: diese Technik wiederholt sich, bis die Glasröhre gänzlich aufgebraucht ist. Reiter empfiehlt Glaskapseln, bei denen kein Umbiegen am Ende des Ausziehens stattfindet: die fertige Glaskapsel besitzt daher eine Spindelform und eignet sich besonders gut zur Blutentnahme in der Praxis, weil die Kapseln leicht in einem leeren Reagenzglas zu transportieren sind (Fig. 89c). Da man den Kapselteil dieser Röhrchen beliebig groß machen kann, ist auch das Auffangen größerer Blutmengen (z. B. aus der Ohrvene der Kaninchen) leicht durchführbar.

Die Blutentnahme mit diesen Kapseln oder gewöhnlichen Kapillaren erfolgt in der Weise, daß man nach Abbrechen der Kapillarenenden eine Oeffnung der Kapillare in wagerechter Haltung an den herausquellenden Bluttropfen heranführt, durch Kapillarattraktion tritt das Blut selbständig in das Röhrchen hinein. Ist es genügend gefüllt, so erwärmt man das leere Ende des Röhrchens eine Sekunde in der Flamme und schmilzt dieses Ende in der Sparflamme des Bunsenbrenners zu. Hierauf legt man das Röhrchen auf den Tisch (kühle Unterlage), es zieht sich dann das Blut des noch offenen Teiles weiter in das Röhrchen hinein, so daß nun auch dieses Ende in der Sparflamme des Bunsenbrenners zugeschmolzen werden kann. Durch einfaches Liegenlassen der Röhrchen scheidet sich das Serum von dem Blutkuchen; Zentrifugieren beschleunigt diese Trennung.

Zum Nachweis von Milzbrandbacillen im Blut benutzt man nach Forster[23] Gipsstäbchen, die mit dem angetrockneten Blut den Untersuchungsämtern zugeschickt werden können. Das Material dient sowohl zur mikroskopischen Untersuchung wie zur Züchtung. Für letztere wird das beimpfte Kulturmedium zur Abtötung anderer Bakterien 10 Minuten lang bei 65° gehalten.

Für manche bakteriologische Untersuchungen benötigt man größere Blutmengen: diese kann man durch Schröpfkopf am Rücken entnehmen. Die Haut wird mit Seife, Alkohol und Aether gereinigt und ein trockener, über der Flamme einen Moment (zur Verdünnung der Luft) erwärmter Schröpfkopf wird aufgesetzt. Hat er „gezogen", so wird er abgenommen, mit einem sterilen Schnepper (s. Fig. 90) an der vorbehandelten Stelle die Inzision gemacht und ein steriler Schröpfkopf sofort wieder aufgesetzt.

Fig. 90.

Sehr praktisch ist der von Sormani angegebene und in den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf Berlin N. hergestellte Apparat (Fig. 91). Dieser besteht aus einem Schröpfkopf mit unterem Tubus, der mittelst Gummistopfens mit einem starkwandigen Probierglas luftdicht verbunden werden kann und einer kleinen Gummipumpe, die mit dem Haupttubus des Schröpfkopfes durch Gummischlauch vereinigt ist. In diese Gummiverbindung ist ein Dreiweghahn eingeschaltet, der sowohl zum Verschluß als auch zum Ein- und Auslassen der Luft dient. Zum Gebrauch wird nach Skarifikation

mit einem Schröpfschnepper das Glas angesogen und dann mit der Gummipumpe in 2 bis 3 Minuten leicht einige Kubikzentimeter Blut abgezapft. Nach Abschließen des Dreiweghahns wird der Gummisauger entfernt und durch vorsichtiges Oeffnen des Hahnes Luft eingelassen, worauf der Apparat leicht vom Körper entfernt werden kann. Der Apparat hat den Vorzug, daß eine Erwärmung des Blutes, die durch das Aufsetzen eines zuvor erhitzten Schröpfkopfes eintritt, vermieden wird.

Fig. 91.

Meistenteils erfolgt die Entnahme größerer Blutmengen aus der Vena mediana: Nach Reinigen der Haut mit Seife, Alkohol und Aether oder durch einfaches Auftupfen einer Spur konzentrierten Lysols an der Einstichstelle (Wright) (muß nach Beendigung der Blutentnahme sorgfältig beseitigt werden) legt man am Oberarm einen Esmarchschen Schlauch oder eine Gummibinde an, so daß die Venen anschwellen, der Radialpuls aber noch deutlich fühlbar ist, und sticht mit einer sterilen Luerschen oder Rekordspritze (siehe unten) in die Vena mediana parallel zum Arm ein. Das Blut steigt von selbst in die Spritze ein. Ist dies in genügender Menge geschehen, wird die Spritze entfernt und die kleine Oeffnung mit einem Pflaster verschlossen. — Das Blut kann jetzt sofort vor der Gerinnung weiter verarbeitet werden: Pattengießen, Herstellung von Nährböden etc.

Die Entnahme des Blutes aus der Armvene kann auch mit einer einfachen Hohlnadel, die mit sterilem Gummischlauch armiert ist, erfolgen. — Apparate zur sterilen Blutentnahme sind in großer Menge angegeben worden, es soll hier nur auf die von Müller[65], Kathe[46] und Ploeger[80], van Loghem[57] und Bronstein[4] (speziell für Tierversuche) hingewiesen werden.

Zur Verhinderung der Gerinnung kann man das frisch gewonnene Blut defibrinieren, das geschieht durch ca. 10—15 Minuten langes Schütteln in einem Glasperlen enthaltenden sterilen Gefäß (Apparat von Dschunkowsky[10] zur sterilen Defibrinierung von Blut bei großen Tieren) oder durch Zusatz von gerinnungshemmenden Mitteln zum Blut. Es wird in erster Linie eine sterile 1,5—2-proz. Lösung von Natrium citricum (Tabletten bei der Firma Parke, Davis & Co., London) oder Hirudin benutzt; Dschunkowsky & Luhs[11] arbeiten mit sterilen, mit $^1/_{10}$ ihres Volumens mit Natrium citricum gefüllten, luftleeren Ampullen, die mit Schlauch und Kanüle verbunden sind.

Zur kulturellen Untersuchung wird das Blut zu 2 oder 3 ccm mit je einem Röhrchen verflüssigten und auf 42—45° abgekühlten Nähragars vermischt und zu Platten ausgegossen.

Die direkte mikroskopische Untersuchung des Blutes geschieht entweder nach Anreicherung etwa vorhandener Mikroorganismen oder direkt nach Anfertigen dünner Ausstriche auf dem Objektträger: Es wird zu diesem Zwecke ein kleiner Blutstropfen auf einen gut gereinigten Objektträger gebracht (dieser ist kurz vorher zweckmäßig über der Bunsenflamme stark erhitzt und hierauf wieder abgekühlt worden), dann streicht man, mit einem Deckgläschen oder der schmalen Kante eines geschliffenen Objektträgers, den Blutstropfen in einem Winkel von 45—50° berührend, in der Richtung des Winkels den Tropfen auf dem Objektträger aus. Die Fixierung geschieht nach dem Lufttrockenwerden in Alcoh. abs. oder Alcoh. absol. + Aether āā $^1/_4$—24 Stunden, oder in Formalindämpfen 5 Sekunden oder in konzentrierter Sublimatlösung 5—6 Minuten oder noch feucht mit Osmiumsäuredämpfen. Es schließt sich die Färbung mit den für die betreffenden Bakterien geeigneten Farblösungen an.

Die Blutentnahme an der Leiche wird aus dem Herzen mit einer Spritze vorgenommen, die mit einer kurzen, weiten Kanüle versehen ist. Die Einstichstelle wird vorher mit einem glühenden Messer verschorft.

Oberndorffer[72] empfiehlt, die Entnahme aus dem rechten Vorhof des Herzens vorzunehmen, wenn es gilt, sofort klares Serum zu gewinnen.

Als Anreicherungsverfahren zum mikroskopischen Nachweis wie zur Züchtung seien folgende Verfahren erwähnt:

Rosenberger[88] verwendet speziell zum mikroskopischen Nachweis von Tuberkelbacillen im Blut eine 2-proz. Natrium-citricum-Lösung, die mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt ist. Er vermischt diese mit gleichen Teilen Blut, schüttelt, läßt 24 Stunden kalt stehen und fertigt vom Sediment dicke Ausstriche an, trocknet diese bei mäßiger Wärme, legt sie in Aqua dest. ein, trocknet nochmals und färbt (siehe auch Kap. III).

Schnitter[92] verwendete das Antiformin zum Nachweis von TB. im Blut (siehe auch Kap. III).

Stäubli[99] saugt den frisch herausquellenden Blutstropfen mit einer Pipette auf, die schon vorher mit 3-proz. Essigsäure benetzt worden ist, und verdünnt nach dem Aufsaugen sofort mit der 10—15-fachen Menge der gleichen Essigsäure, zentrifugiert und färbt das Sediment zum Nachweis von Mikroorganismen nach Giemsa oder May-Grünwald.

Neufeld[69] reichert Typhusbacillen aus Roseolen und Blut dadurch an, daß er das Material sehr stark mit dem Nährsubstrat verdünnt, um eine bakterizide Wirkung zu verhüten.

Wiens[104] nimmt speziell zur Anreicherung von Pneumokokken und Typhusbacillen eine Lösung von 10 Proz. Pepton und 1 Proz. Dextrose; zu 10 ccm dieser Lösung kommt 1 ccm Blut. Reiner Müller & Gräf[66] empfehlen eine Blutegelextraktlösung (0,1 in 2,5 physiologischer Kochsalzlösung).

Conradi[2] eine Rindergallenlösung:

90 ccm Galle,
10 g Pepton,
10 „ Glyzerin.

2) Untersuchung von Eiter. Die Entnahme geschieht durch aseptische Inzision oder Punktion, das Auffangen in sterilen Gefäßen. Dünnflüssiger Eiter läßt sich auch in Kapillaren bezw. Glaskapseln aufnehmen.

3) Zur bakteriologischen Untersuchung der Mund- und Nasenhöhle werden die zu untersuchenden Stellen mit der Platinöse oder sterilen kleinen Schwämmchen oder mit einem sterilen, an einem Holzstäbchen, Glasstabe, Draht etc. befestigten Wattebausch, die man sich in sterilen Reagenzgläsern vorrätig hält, betupft. Kann die Untersuchung nicht sofort vorgenommen werden, so bringt man den mit Untersuchungsmaterial bedeckten Bausch wieder in das sterile Röhrchen zurück und verschließt es mit einem Wattestopfen. Auch Kornzangen und Pinzetten, an die man einen sterilen Wattebausch befestigt, lassen sich verwenden. Zur Untersuchung des Nasenrachenraumsekretes muß man sich biegsamer Drähte bedienen, denen man die gewünschte Form gibt und an deren Ende der sterile Wattebausch angebracht wird. Die kulturelle Untersuchung wird, wie im Kapitel III beschrieben, durch Beimpfung mehrerer Platten ausgeführt. Die mikroskopische Untersuchung weist keine Besonderheiten auf.

4) Sputum soll zur Untersuchung in sterilen Glasgefäßen möglichst ohne Speichel aufgefangen werden. Das Gefäß darf keine Desinfizientien enthalten, auch Zusatz von sterilem Wasser ist unnötig.

(Ueber Anreicherung von Tuberkelbacillen vergleiche Kap. III.)

5) Exsudate und Transsudate werden mit steriler Spritze oder Troikart mittels Punktion unter aseptischen Kautelen entnommen. Cerebrospinalflüssigkeit gewinnt man durch Lumbalpunktion: Man sticht am seitlich und gekrümmt liegenden Patienten mit einer langen, durch Mandrin geschützten Nadel 1 cm seitlich vom unteren Rande des III. Lendendornes ein, und richtet die Nadel etwas nach oben und so weit medialwärts, daß in 5—6 cm Tiefe die Mittellinie erreicht ist. Nach Herausziehen des Mandrins werden die hervorquellenden Tropfen steril aufgefangen.

Zur weiteren Untersuchung wird man unter Umständen die Zentrifuge zu Hilfe nehmen müssen.

6) Urin entnimmt man entweder mit sterilem Katheter oder in der Weise, daß man nach gründlicher Reinigung des Orificium urethrae externum den ersten Teil des Harnstrahles unbenutzt läßt, den Rest in sterilem Kolben auffängt. Auch hier muß unter Umständen erst durch Zentrifugieren genügendes Material für die bakterio-

logische Untersuchung gesammelt werden. (Ueber die Untersuchung des Harnes auf TB. vergleiche Kap. III.)

7) Faeces fängt man in sauberen Gefäßen, die kein Desinficiens enthalten dürfen, auf (für Massenuntersuchungen sterile Pappteller), auch eine direkte Entnahme aus dem Anus mittels geeigneter Instrumente ist möglich. Jehle[43] hat zur sterilen Stuhlentnahme bei Kindern eine Glasröhre angegeben, die mit steriler Kochsalzlösung gefüllt in das Rectum eingeführt wird. Die NaCl-Lösung wird fast ganz in den Darm eingeblasen, hört man mit Blasen auf, so dringt die jetzt mit Schleim und Kot vermischte Kochsalzlösung wieder in das Rohr ein.

Sollen Schleimflocken zur Untersuchung kommen, so wird der Stuhl in Schalen mit sterilem Wasser zerrührt. (Ueber Nachweis der Tuberkelbacillen mit Antiformin vergleiche Kap. III.)

8) Mageninhalt gewinnt man mittels des Magenschlauches. Der Nachweis von Typhusbacillen bei Typhusbacillenträgern gelingt nach Weber[103] in der folgenden Weise: Man läßt 200 ccm Oel trinken, hebert nach $^1/_2$ Stunde den Magen aus und erhält so eine wässerige untere und eine ölige, gallig gefärbte obere Schicht; in der letzteren gelingt sehr häufig der Nachweis der Typhusbacillen.

9) Untersuchung von syphilitischem Material: Am leichtesten gelingt der Nachweis der Spirochaete pallida in noch nicht spezifisch behandelten Krankheitsprodukten. Hat eine lokale Behandlung mit Medikamenten schon stattgefunden, so müssen die zu untersuchenden Stellen sorgfältig von jedem derartigen Mittel befreit und vor der Entnahme des Materials für ca. 24 Stunden mit trockener oder mit in Kochsalzlösung getauchter Gaze verbunden werden.

Fig. 92.

Die Entnahme des Materials kann nach einer der folgenden Methoden geschehen: Auf die mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigte Stelle wird ein kleiner Klappscher Sauger für einige Minuten gesetzt. Die heraustretende klare seröse Flüssigkeit wird auf dem Objektträger ausgestrichen. Zweckmäßig bedient man sich bei dieser Methode des Schuberg-Mulzerschen Saugers (Fig. 92), der das Sammeln des Serums durch eine seitlich angebrachte Ausbuchtung erleichtert. Blaschko preßt mit einer Kornzange oder einer Arterienklemme die zu untersuchende Stelle zusammen und erhält auch so genügende Menge Material. Auch durch starkes Reiben der erkrankten Partie mit Platinspatel oder scharfem Löffel, ferner durch Zerquetschen oder Zerreiben von exzidierten Papeln und Primäraffekten läßt sich für die Untersuchung geeignetes Material gewinnen.

Unter Umständen wird man auch die Punktion der Drüsen heranziehen müssen: Die Haut der Leistengegend wird rasiert und desinfiziert. Nach Schaudinn & Hoffmann[90] wird mit einer etwa 5 ccm fassenden sterilen Spritze, die mit langer steriler Kanüle armiert ist, von außen her in die mit der linken Hand umfaßten und auf solche Weise gut fixierten Leistendrüsen eingestochen. Durch tastendes Vorgehen sucht man in eine der größten Drüsen zu gelangen und aspiriert. Erhält man nicht genügend Saft, so schiebt man unter Kontrolle der linken Hand die Kanüle in eine der benachbarten Drüsen.

Zum Nachweis der Spirochaete pallida im Blut verfahren Noeggerath & Staehelin [71] ähnlich wie Stäubli (s. o.): Sie verdünnen das Blut mit 10 Teilen einer $^1/_3$-proz. Essigsäure, schütteln, zentrifugieren und fertigen von dem Sediment Ausstrichpräparate an.

B. Methoden der bakteriologischen Untersuchungen der Luft.

Zum qualitativen Nachweis der Bakterien in der Luft aspirierte Miquel [63] die Luftkeime auf mit klebriger Flüssigkeit bestrichene Objektträger. Koch [50] ließ die Bakterien sich spontan auf bestimmte Zeit offen hingestellte, mit Gelatine übergossene Platten absetzen und beobachtete die zur Entwickelung kommenden Keime. Diese Methoden geben schon annähernden Aufschluß über die Zahl der in der Luft vorhandenen Mikroorganismen. Um jedoch diese genauer festzustellen, verfuhr man in der Weise, daß man gemessene Quantitäten Luft durch Flüssigkeiten (Miquel) oder über feste Nährböden (Hesse [38]) hinstreichen ließ und dann die Zahl der eingebrachten Keime bestimmte oder die Bakterien in Filtern auffing und diese nachher zur Entwickelung in Nährmedien brachte (Petri [77]). Um das Luftquantum abzumessen, bedarf es eines geaichten Aspirators resp. einer geaichten Luftpumpe; falls diese nicht vorhanden sind, muß das Luftquantum mit Hilfe einer Gasuhr gemessen werden.

Fig. 93.

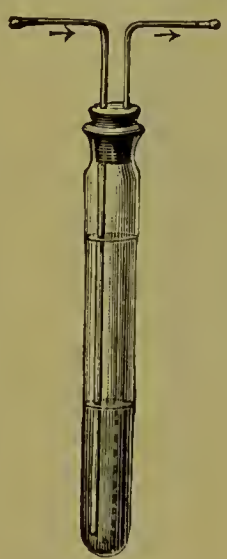


Fig. 94.

Miquel bestimmte den Keimgehalt der Luft auch in der Weise, daß er sie durch steriles Wasser durchsaugen ließ und nachher die keimhaltige Flüssigkeit, die zuvor zur Keimtrennung kräftig geschüttelt wurde, zu gleichen Portionen in 40—50 Kolben mit steriler Bouillon verteilte. Die Aspiration und eventuelle Verdünnung der Waschflüssigkeit ist so zu regeln, daß etwa 25 Proz. der Kolben steril bleiben. Emmerich [14] suchte eine innigere Berührung der keimhaltigen Luftblasen mit der Flüssigkeit dadurch zu erreichen, daß er die Luft durch ein vielfach gewundenes mit steriler Flüssigkeit gefülltes Glasrohr schickte (Fig. 93).

Sehlen [96] sowie Hueppe (Lehrb.) verbesserten diese Methode dadurch, daß sie die Luft nicht durch Flüssigkeit, sondern durch verflüssigte, gelatinierende Nährmedien schickten. Hueppe bediente sich

dabei einer Versuchsanordnung ähnlich, der, die er für die Züchtung anaërober Bakterien in Reagenzglaskulturen unter Wasserstoff angegeben hat (Fig. 94). Nur sitzt hier der zweifach durchbohrte, mit Röhrchen armierte Gummipfropfen nicht dem Reagenzglas direkt auf, sondern in einem auf das Reagenzglas gestülpten Glashelm (ähnlich dem Pasteurschen Verschluß), um eine Verunreinigung beim späteren Ausgießen des Inhalts zu Platten zu vermeiden. Durch das längere Rohr des Gefäßes tritt die Luft ein, das kürzere ist mit dem Aspirator verbunden. Auf dem gleichen Prinzip beruhen Apparate, die von Kammerer & Giacomi[44], v. Straus & Würz[100] angegeben sind.

Die Methode des Arbeitens mit Flüssigkeiten hat den Vorzug, daß man Bakterienverbände, wie sie gerade in der Luft auf Staubteilchen sitzend so häufig vorkommen, durch Schütteln trennen kann, so daß die Einzelindividuen zu isolierten Kolonien auswachsen. Andererseits aber ist das Verfahren sehr umständlich und es findet bei dem immerhin nur langsamen Hindurchleiten bereits während des Versuchs eine störende Vermehrung schnellwachsender Arten statt.

Ein Verfahren, bei dem diese Fehlerquelle fortfällt und das auch sonst relativ einfach in seiner Handhabung ist, stammt von Hesse Der von ihm benutzte Apparat (Fig. 95) besteht im wesentlichen aus einer Glasröhre von 70 cm Länge und 3,5 cm Durchmesser, die mit steriler Gelatine so ausgerollt ist, daß auf der Bodenfläche ein etwas reichlicherer Gelatinebelag besteht. Der Verschluß wird an der einen Seite durch zwei Gummikappen bewirkt, von denen die eine innere einen runden Ausschnitt besitzt. Im anderen Ende steckt ein fest schließender Gummistopfen, in dessen zentraler Bohrung sich ein Glasrohr befindet, das mit dem Aspirator in Verbindung steht. Der Apparat ist auf ein Stativ aufgesetzt. Wird er in Betrieb gesetzt, so wird die an einem Ende befindliche, undurchbohrte Gummikappe abgenommen und die Luft durch die Oeffnung in der zweiten Gummikappe langsam aspiriert, daß etwa in der Minute ½ l Luft hindurchgeht. Die Keime setzen sich auf der Gelatine nieder und können nach dem Auswachsen gezählt und bestimmt werden.

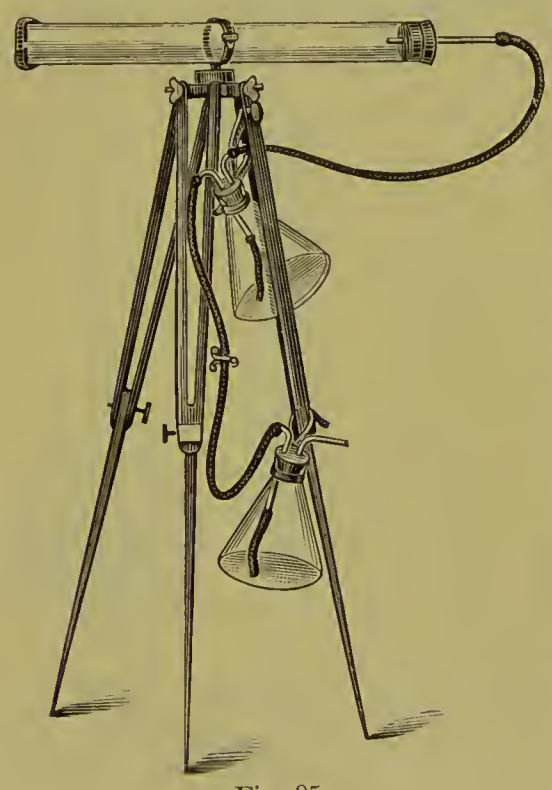


Fig. 95.

Aehnlich dem Hesseschen Verfahren ist ein Verfahren von Miquel, das auf dem Prinzip beruht, daß Mikroorganismen kapillare Röhren nicht passieren, sondern an den Wänden haften bleiben. Der Apparat besteht aus einem Erlenmeyerkolben, der nach oben in eine Glasröhre ausläuft, die an ihrem unteren Teil verengt ist. In die Verengerung ist ein Wattepfropf eingelassen, ein zweiter schließt das

obere Ende der Röhre. An der Seitenwand des Kolbens wenig über dem Boden befindet sich eine Tubulatur mit einem Korkstopfen, durch den ein dünner Glasstab in das Innere des Kolbens fast bis zur entgegengesetzten Wand reicht. Man bringt soviel des gelatinierten Nährmediums in den Kolben hinein, daß der Glasstab vollständig bedeckt ist, neigt dann das Gefäß etwas, daß die Spitze des Glasstabes wieder aus dem Nährmedium herausragt und läßt den Nährboden in dieser Lage erstarren. Dann verbindet man das obere Ende des Kolbens mit dem Aspirator, zieht den Glasstab aus der Gelatine heraus und läßt nun die Luft durch den gebildeten, engen Kanal hindurchströmen. Zum Schluß schließt man die Tubulatur wieder mit einem Korkstopfen. Das Nährmedium, in dem beim Durchleiten der Luft durch den Nährbodenkanal alle Keime haften geblieben sind, wird wieder verflüssigt und zur sorgfältigen Verteilung der Keime geschüttelt. Diese kommen dann innerhalb des Kolbens zur Entwickelung und können gezählt werden. Der Kontrollwattepfropf, der an der Verengerung des kapillaren Röhrchens sitzt, bleibt meistens steril, da in dem engen und feuchten Kanal vorher alle Keime zurückgehalten wurden.

Diese Methoden haben jedoch gegenüber der Verwendung von Flüssigkeiten wieder den Nachteil, daß unter Umständen Bakterienverbände, nicht einzelne Individuen zu Kolonien auswachsen. Man erhält auf diese Weise geringere Werte als bei der Verwendung von Flüssigkeiten.

Frankland[25] und Petri (l. c.) haben unabhängig voneinander eine Methode angegeben, die von den Mängeln der beiden vorigen frei ist. Die Luft wird nach der Anordnung von Petri vermittels einer Luftpumpe durch sterilisierten Quarzsand von $^1/_3$—$^1/_4$ mm Korngröße geleitet. Dieser Sand befindet sich in einer 6—10 cm langen, beiderseits offenen Glasröhre von Reagenzglasdicke. An der mit dem Aspirator verbundenen Seite ist sie mit einem Gummipfropfen mit zentraler Bohrung, in der sich ein Glasrohr befindet, geschlossen. Der Verschluß auf der andern Seite ist durch einen Wattepfropf bewerkstelligt, der beim Versuch herausgenommen wird. Das Innere der Röhre ist mit Quarzsand ausgefüllt. In der Mitte der Filtermasse befindet sich eine Drahtgazekappe, die das Filtermaterial in zwei Portionen trennt. Die Luft wird nun durch das senkrecht gestellte Filter durchgeleitet (etwa 10 l pro Minute 10—20 Minuten lang). Die vordere Hälfte des auf diese Weise infizierten Sandes wird in verflüssigtes Nährmedium gebracht, dort zur Keimtrennung gut geschüttelt und zur Plattenaussaat und eventuellen Keimzählung benutzt. Die andere Hälfte des Filtersandes wird in gleicher Weise zu Kontrollplatten verwandt. In ihr sollen sich keine Keime mehr befinden.

Der Apparat hat durch Ficker[19] eine Reihe von Verbesserungen erfahren (Fig. 96). Statt der Luftpumpe benutzte er einen spindelförmigen Gummiballon von bekanntem Luftinhalt. Die Filterröhre ist hinter der Einströmungsöffnung für die Luft erweitert. Der Luftzutritt erfolgt durch eine eingefügte engere Röhre. Auf diese Weise ist der Luftstrom gezwungen, die Mitte des Filters zu passieren, während bei der Petrischen Anordnung die Luft zum Teil durch die Lücken zwischen Glaswand und Röhreninhalt durchstreichen konnte, ohne die Keime abzugeben. Die Sandkörner ersetzte Ficker

durch Glasstaub, da auf den mit Sand beschickten Platten wegen der entstehenden Trübung der Gelatine die Entwicklung der Kolonien sich weniger gut beobachten ließ.

Ficker[20] verwendet neuerdings luftleere Röhrchen, in denen sich 10—20 cm neutrale Nährgelatine befindet. Diese wird vor dem Gebrauch erwärmt und an den Wänden ausgerollt. Ist die Gelatine wieder erstarrt, so wird die ausgezogene Spitze der Röhre, nachdem sie angefeilt und in der Flamme sterilisiert ist, abgebrochen. — Durch die einströmende Luft werden etwaige Luftkeime mit der Gelatine in Berührung gebracht, die Luftmenge wird später durch Wasserfüllung ermittelt. Durch die Firma Lautenschläger werden die Röhrchen in geeigneter Form in den Handel gebracht (Fig 97).

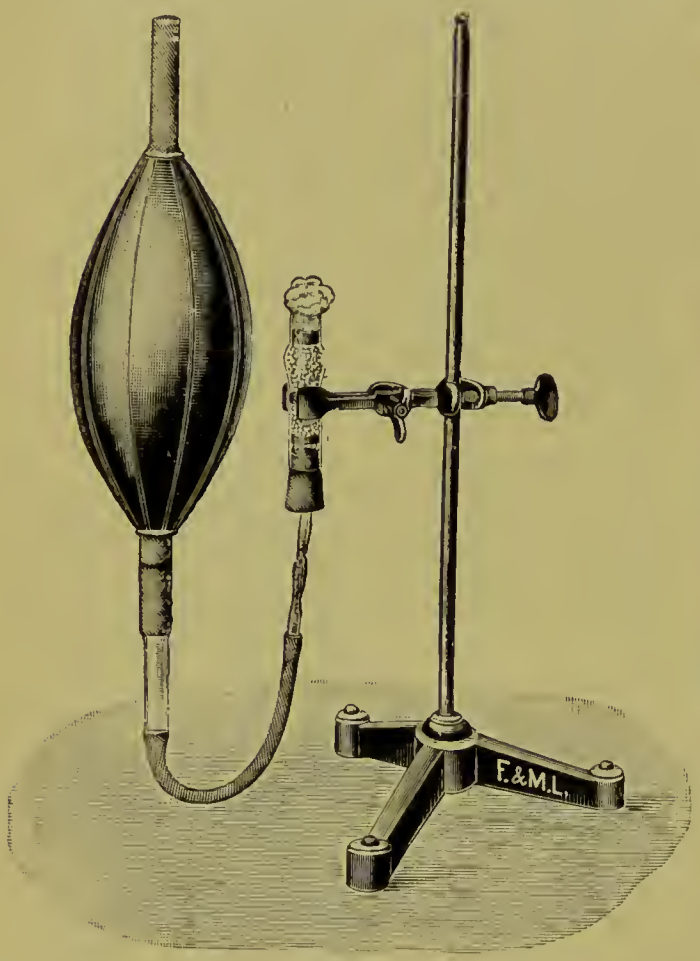


Fig. 96.

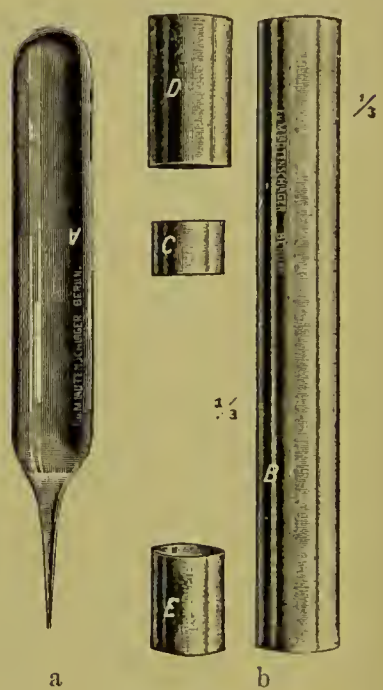


Fig. 97.

Frankland[25] nahm als Filtermaterial eine lösliche Substanz (Zuckerpulver). M. Hahn[33] benutzte zur bakteriologischen Untersuchung höherer Luftschichten statt des Fickerschen Filters solche mit Körnern aus geschmolzenem Bergkristall (zu beziehen durch Heräus in Wetzlar). Die Hauptschicht und Kontrollschicht werden getrennt in zwei Petrischalen von je 27 cm Durchmesser untersucht. Der Sedebauersche Aspirator, der aus einer zweizylindrischen Pumpe mit Zählwerk besteht und durch Elektromotor mittels Akkumulator betrieben wird, erwies sich für die Untersuchung höherer Luftschichten, die im Ballon vorgenommen werden, am praktischsten. Vor jeder Luftuntersuchung wird der Apparat, der an der Peripherie des Ballons aufgehängt ist, mit neuem Filter versehen.

Zum Nachweis pathogener Bakterien, die wegen ihres langsamen Wachstums oder aus anderen Gründen mit dem Züchtungsverfahren der Beobachtung entgehen, muß i. R. der Tierversuch angewandt werden. Tuberkelbacillen hat auf diese Weise Cornét[7] durch Impfung auf Meerschweinchen im Staub von Krankenzimmern gefunden. Es ist jedoch Flügge[22] und seinen Schülern gelungen, auch direkt Tuberkelbacillen, die beim Husten, Sprechen oder Niesen der Kranken an feinsten Tröpfchen haftend nach außen gelangten, auf Objektträgern aufzufangen und durch Färbung nachzuweisen.

C. Die Methoden der bakteriologischen Untersuchung des Bodens.

Eine genaue quantitative Untersuchung der Bakterien des Bodens ist mit großen Schwierigkeiten verknüpft, da namentlich in den oberen Bodenschichten die Keimzahl eine sehr hohe ist und die Mikroorganismen des Bodens die heterogensten Wachstumsbedingungen erfordern. Es finden sich anaërobe Arten neben aëroben, solche, die bereits bei den niedrigsten Temperaturen wachsen neben ausgesprochen thermophilen. Zudem ist eine gleichmäßige Verteilung der entnommenen Bodenproben im Nährmedium fast unmöglich.

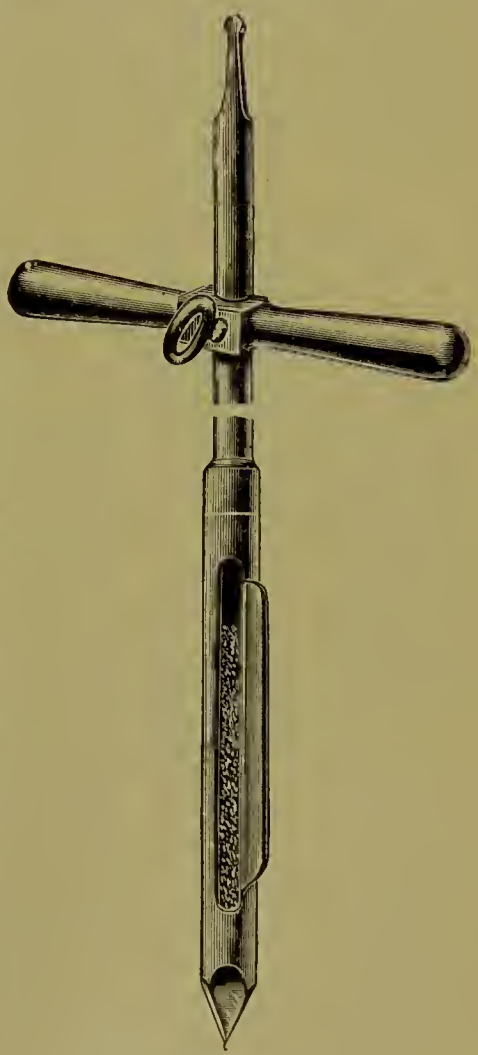


Fig. 98.

Die Entnahme der Bodenproben von der Oberfläche geschieht nach Fränkel[26] mit einem aus Platin bestehenden, zuvor sterilisierten, kleinen Löffel von bekanntem Inhalt. Sollen Erdproben aus der Tiefe keimfrei gewonnen werden, so benutzt man einen gleichfalls von Fränkel angegebenen Bohrer (Fig. 98). Derselbe besitzt oberhalb der Windung eine durch eine Hülse verschiebbare Kammer. Der Bohrer wird bei geschlossener Kammer in die betreffende Tiefe hineingebohrt. Bei einer geringen Drehung nach rechts öffnet sich in der Tiefe die Kammer und die Erde kann in diese eintreten. Eine Drehung in der entgegengesetzten Richtung schließt wiederum automatisch die Kammer. Diese und die Hülse sind vor dem Gebrauch zu sterilisieren.

Der von Nagel angegebene Bohrer ist in der Art eines Troikarts gebaut. Nach Einsetzung des Bohrers wird die unterste Spitze herausgezogen und durch ein Entnahmegefäß ersetzt.

Die Untersuchung der entnommenen Bodenproben muß wegen der schnellen Vermehrung der Keime möglichst sofort erfolgen. Fränkel

brachte Erdpartikel in verflüssigte Gelatine, zerkleinerte sie mit einem sterilen Platindraht und goß Rollröhrchen.

Eberbach[12] zerrieb die Erde zuvor mit sterilem Sand.

Man kann auch eine bestimmte Bodenmenge (als Einheit benutzt man 1 ccm) mit sterilem destillierten Wasser verreiben, dann in eine größere Wassermenge eintragen und durch kräftiges Schütteln der Keime in das Wasser überführen, von dem man einen Teil zur Aussaat benutzt. Wegen der großen Zahl der zur Entwickelung kommenden Keime ist es nötig, starke Verdünnungen anzulegen. Da im Boden, wie bereits erwähnt, Keime vorkommen, die die verschiedensten Lebensbedingungen haben, so muß man sowohl Züchtungen bei höheren wie niederen Temperaturen und auch bei Luftabschluß vornehmen, wenn man ein Urteil über alle vorkommenden Arten gewinnen will.

Zum Nachweis der im Boden vorkommenden pathogenen Keime, wie Erreger des Tetanus und des malignen Oedems, dient der Tierversuch. Man überträgt verdächtige Bodenproben geeigneten Versuchstieren in eine Hauttasche. Von den eingehenden Tieren sind die Keime relativ leicht (direkt oder nach weiteren Tierpassagen) zu isolieren.

D. Die Methoden der bakteriologischen Untersuchung des Wassers.

1. Entnahme des Wassers.

Die Entnahme des Wassers zur quantitativen bakteriologischen Untersuchung geschieht mit sterilen Gefäßen. Die Entnahme ist eine verschiedene, je nachdem es sich um ein offenes Wasser, eine Leitung oder einen Brunnen handelt. Wird das Wasser einer Leitung untersucht, so hat man einfach, nachdem das in den Röhren stagnierende Wasser abgelassen ist, ein Erlenmeyerkölbchen oder ähnliches Gefäß an dem Auslaßhahn zu füllen. Pfuhl[79] hat vorgeschlagen, den oberen Teil des Kölbchens vor dem Sterilisiren mit einer über die Mündung greifenden und mit Bindfaden fixierten Wattekappe zu versehen, damit nicht beim Füllen Keime vom Rand in das Innere des Kölbchens gelangen können.

Zur Untersuchung eines neu angelegten Röhrenbrunnens wird nach M. Neissers[68] Vorschlag zunächst die Leitung mit Dampf sterilisiert und dann das nach einiger Zeit des Pumpens kalt abfließende Wasser zur Untersuchung verwendet, damit man ein reines Bild vom Keimgehalt des Wassers bekommt und nicht durch Verunreinigungen, die aus der Leitung stammen, gestört wird. Handelt es sich dagegen um die Prüfung eines bereits im Gebrauch befindlichen Röhrenbrunnens, so ist für gewöhnlich eine Reinigung der Pumpe zu unterlassen, da es dann in der Regel auf eine Untersuchung des Wassers möglichst in dem Zustand ankommt, in dem es unter den gewöhnlichen Verhältnissen entnommen wird.

Bei oberflächlichen Gewässern, wie Flußläufen, Teichen, entnimmt man das Wasser möglichst vom Ufer entfernt. Man wirft zu diesem Zweck, falls man nicht mit einem Boot an die betreffende Stelle gelangen kann, vom Land aus eine an einem Faden befestigte, sterile und mit einigen sterilen Schrotkörnern belastete Flasche mög-

lichst weit vom Ufer weg in das Wasser. Das untersinkende und sich füllende Gefäß zieht man am Faden heraus.

Zur Entnahme von Wasserproben aus einer bestimmten Tiefe sind besondere Flaschen angegeben, deren Füllung erst in der gewünschten Tiefe vor sich geht. Man benutzt nach v. Esmarch Flaschen (Fig. 99), die durch eine mit Blei beschwerte Gummikappe verschlossen sind und die mittels eines angehängten Gewichtes an einer Schnur bis zur bestimmten Tiefe in das Wasser versenkt werden. Durch Zug von außen an einer zweiten am Verschlußstück befestigten Schnur wird nunmehr die Flasche geöffnet, so daß das Wasser einströmen kann. Durch Lockerlassen der Schnur schließt sich die

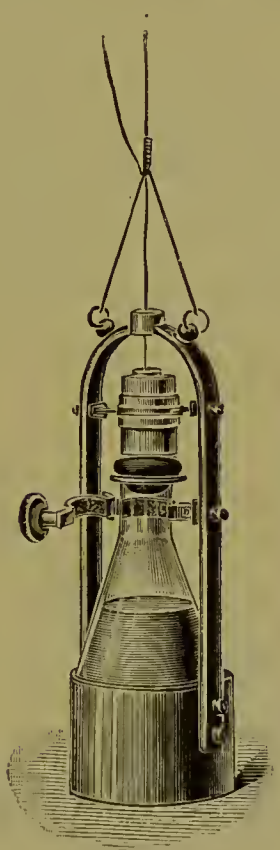


Fig. 99.

Fig. 100.

Flasche und wird, ohne daß der Inhalt mit dem Wasser in anderen Schichten in Berührung kommen kann, herausgezogen. Roux evakuierte Gefäße, die am oberen Ende in ein zugeschmolzenes, kapillares, gewundenes Glasrohr ausgezogen waren (Fig. 100). Mit Hilfe eines angehängten Gewichtes *C* wird das Kölbchen *A* in ein Gefäß *B* eingeschlossen in die Tiefe versenkt. An dem kapillaren Hals ist bei *A* eine Schnur befestigt, mit der, sobald das Kölbchen die gewünschte Tiefe erreicht hat, der Hals abgerissen wird. Das Wasser stürzt nunmehr in das luftleere Kölbchen hinein und füllt es bis zum Rand.

Die Evakuierung derartiger Glasgefäße vor dem Gebrauch geschieht in der Weise, daß sie zur Hälfte mit destilliertem Wasser

gefüllt werden, das man nunmehr vollständig zur Verdampfung bringt. Sobald das Wasser bis auf Spuren verdampft ist, schmilzt man, während noch der Wasserdampf entweicht, die enge Oeffnung des Gefäßes zu.

Der von Meyer[61] beschriebene, an dem Straßburger hygienischen Institut zur Entnahme von Wasserproben benutzte Apparat beruht im wesentlichen darauf, daß an einem Stativ das Entnahmekölbchen in das Wasser bis zur bestimmten Tiefe versenkt wird. Die $2^3/_4$ m lange Stativröhre ist in drei Teile zerlegbar. Das Entnahmekölbchen trägt einen Stopfen, welcher durch eine auf der Stativröhre gleitende starke Spiralfeder angedrückt und in der gewünschten Tiefe mittels eines Drahtes bis zur Füllung der Flasche gelüftet wird. Damit beim Nachlassen des Zuges der Stopfen wieder gut auf die Mündung paßt, dient eine dem Stopfen nach unten durchbohrende Schraube als Führung.

a b c

Fig. 101.

Ein Wasserproben-Entnahmeapparat, der den Vorzug größter Einfachheit besitzt, ist speziell für bakteriologische Untersuchungen von Slavo-Czaplewski[95b] (Fig. 101a) angegeben worden. Bei dem Apparat wird ein Senklot mit einer Metallklammer an einer Schnur in die Tiefe hinabgelassen. In dieser Metallklammer befindet sich ein luftleeres Glasröhrchen (Abschlageröhrchen, Fig. 101b u. 101c), bei dem in der gewünschten Tiefe ein Ansatzröhrchen mittels eines Fallgewichts zertrümmert wird, so daß das zu prüfende Wasser in das Glasröhrchen einströmt.

Der Wasserentnahmeapparat nach Spitta-Imhoff[73]*) (Fig. 102) entnimmt gleichzeitig drei Quantitäten Wasserproben zur chemischen Untersuchung, zur Bestimmung des Gasgehaltes und zur bakteriologischen Untersuchung aus bestimmter Tiefe. Durch den Auftrieb, den die viereckige Flasche unter Wasser erleidet, wird selbsttätig ein Fallgewicht ausgelöst, das den Hals des kleinen Anschlageröhrchens zertrümmert, um die Probe zur bakteriologischen Untersuchung anfzunehmen. Der ganze Apparat läßt sich bequem in einem Lederetui transportieren (Fig. 103).

Fig. 102.

Der Apparat von Kraus[51] ist im wesentlichen eine Modifikation des Sclavoschen Apparates. Das luftleere, mit einer ausgezogenen Spitze versehene Wasserentnahmekölbchen wird in eine Schutzhülse verschraubt an einer Schnur in das Wasser gelassen. In bestimmter Tiefe wird die ausgezogene Spitze durch ein mittels Federzug vorschnellendes Messer abgeschlagen.

2. Bestimmung der Keimzahl des Wassers.

Das entnommene Wasser muß möglichst sofort zur Keimzählung verwandt werden, da sehr schnell eine Vermehrung der Bakterien auch bei niederen Temperaturen stattfindet.

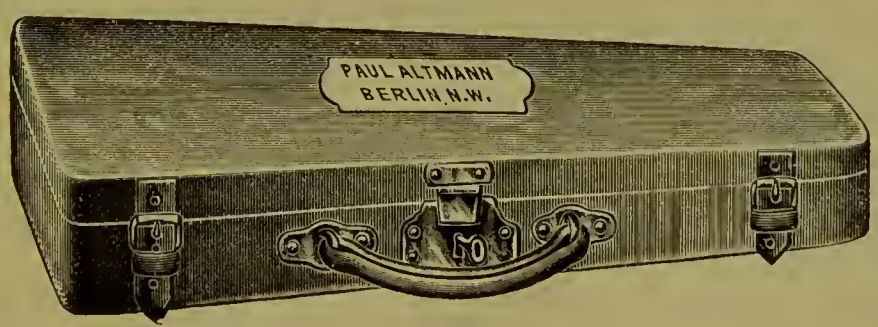


Fig. 103.

Die Bestimmung des Keimgehalts erfolgt allgemein nach dem Kochschen[50] Plattenverfahren. Es besteht im Prinzip darin, daß man die in einer bestimmten Wassermenge enthaltenen Keime auf einem festen Nährboden an getrennten Stellen sich zu Kolonien entwickeln läßt, deren Zahl (unter der Voraussetzung, daß jede Kolonie

*) Spitta-Imhoff, Modell der Königl. Preuß. Versuchsanstalt für Wasserversorgung, Berlin.

aus nur einem Keim entstanden ist und daß alle Bakterien zu Kolonien auswachsen) diejenige der ursprünglich vorhandenen Bakterien angibt.

Um das Plattengießen auch am Ort der Entnahme ausführen zu können und eine Vermehrung der Keime bei langem Transport zu verhindern, haben v. Esmarch, Proskauer, Hilgermann und andere besondere Ausrüstungskästen mit den nötigen Utensilien angegeben.

Der Kasten von Hilgermann[41a] enthält neben sämtlichen zur bakteriologischen Wasseruntersuchung erforderlichen Utensilien sowohl einen Kühlapparat als auch einen Plattengießapparat. — Das Gewicht des ganzen Kastens beträgt trotzdem nur $8^1/_2$ kg (Lautenschläger).

Schumburg[95a] füllt in Kulturflaschen, die mit sterilisierter Nährgelatine oder dgl. beschickt sind, die Wasserprobe mittels des als Stöpsel dienenden Meßgefäßes zu 1 ccm ein und setzt den Stöpsel rasch wieder auf (Fig. 104).

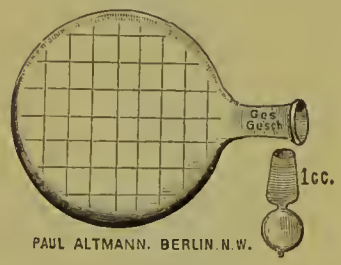


Fig. 104.

Fig. 105.

Die Kulturflaschen sind rund und flach, tragen auf der einen Seite eine eingeätzte Quadrateinteilung und werden in einem achtfächerigen, mit Filz bekleideten Blechkasten aufbewahrt, der wiederum sich in einem Holzkasten befindet (Fig. 105). Am Ort der Wasserprüfung wird der Blechkasten dem Koffer entnommen und, nachdem das im Innern befindliche Thermometer in den Deckel eingesetzt ist, auf dem Herd oder besser in einem Wasserbad so lange erhitzt, bis das Thermometer eine Innentemperatur von 35—40° anzeigt. Dann wird das Thermometer wieder an seinen Ort gesteckt (im Innern des Kastens) und die Oeffnung im Deckel durch einen Korkpfropfen verschlossen. Mit dem Blechkasten begibt man sich nun zu den zu untersuchenden Brunnen, entnimmt dem Kasten ein Kulturfläschchen, dessen Nährgelatine natürlich noch flüssig sein muß, entfernt mit der rechten Hand den Glasstopfen, füllt seine Höhlung mit dem zu untersuchenden Wasser und setzt ihn wieder auf, so daß das Wasser mit der Nährgelatine sich mischt. Eine Berührung der Ränder des Innern des Fläschchens wie der sterilen Stöpselfläche ist dabei gänzlich ausgeschlossen, der Luftzutritt ist auf ein Minimum beschränkt, in jedem Fall geringer, als wenn das Wasser erst in die Pipette, dann in ein Reagenzglas und schließlich in die Schale gebracht wird. Auch sind

Verluste des Wassers bei Verwendung der Kulturflaschen nicht vorhanden, wie das bei der gewöhnlichen Uebertragung erst in Gelatineröhrchen und dann auf Schalen der Fall ist. Die Erstarrung der Gelatine auf der mit Quadratur versehenen Breitseite erfolgt in der kälteren und gemäßigten Jahreszeit im Freien, im Sommer zweckmäßig in Eiswasser. Nachdem die Kulturflaschen sämtlich mit Wasserproben beschickt sind, werden sie in den nun wieder abgekühlten Blechkasten verpackt, in welchen man im Sommer zur Verhinderung der Verflüssigung der Gelatine noch eine Eisblase legt. Die entstandenen Kolonien lassen sich leicht auszählen und einzelne derselben durch den weiten Hals der Flasche behufs Anlegen von Reinkultur leicht erreichen. Zum Transport von am Ort der Untersuchung gegossenen Platten ist der Kràlsche Kühlapparat geeignet, der 12 Petrischalen aufnehmen kann. Der Apparat besteht aus einem doppelwandigen Behälter, der vollständig mit Filz umgeben ist und mit Eis gefüllt wird.

Ist die Aussaat an Ort und Stelle nicht möglich, so wird das Wasser in Eis verpackt der Untersuchungsstation zugeschickt. Es ergibt alsdann die Untersuchung der Keimzahl aber kein genaues Bild mehr, da durch die Einwirkung der Kälte nicht eine Vermehrung aller Bakterienarten hintan gehalten wird und auf der andern Seite auch wieder ein Absterben empfindlicher Arten statthaben kann.

Bertarelli[3] empfiehlt zum Transport von bakteriologischen Wasserproben nach dem Laboratorium in Gegenden, wo Eis zur Kühlung fehlt, folgenden Apparat: Er besteht aus einem geschlossenen Zylinder mit Bügel zum Tragen und verschließbaren Einfüll- und Ablauföffnungen. In den Zylinder hinein hängt ein Metallkasten mit 6 röhrenförmigen Abteilungen für je eine Reagenzröhre. In den geschlossenen Innenraum werden 1200—1300 g Ammoniumschwefelcyan in Kristallen oder Pulver gebracht, dazu im Augenblick der Probeentnahme 1 Liter Wasser. Nach Verschluß schüttelt man den Apparat. Ist die beabsichtigte Temperaturerniedrigung eingetreten, so werden die Proben in Reagenzröhren in die Röhren des Zentralraumes eingestellt. Bei 22—24° Lufttemperatur kann man im Innenraum in der 1. Stunde 0,8 erhalten. Die Temperatur steigt dann langsam in der 2. Stunde auf 3—3,5° und hat erst nach 8—10 Stunden 12° erreicht. Der Apparat ist gut mit Filz zu isolieren. Das Salz kann nach Ausgießen durch Kristallisieren in einer Schale leicht wieder gewonnen werden. Der Apparat wiegt nur 4—5 kg und das Ammoniumschwefelcyan ist nicht teuer. Im Innern muß der Apparat gut verzinnt sein, um von dem Salz nicht angegriffen zu werden.

Die Verarbeitung der Wasserproben zur Keimzählung gestaltet sich i. R. folgendermaßen. Man bringt in ein Röhrchen mit verflüssigter Gelatine je nach dem Keimgehalt 0,1—1 ccm des Wassers und sorgt durch leichtes Schütteln für eine Trennung etwaiger Bakterienverbände. Sehr stark keimhaltiges Wasser wird vorher mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt und ein aliquoter Teil der Verdünnung zur Plattenaussaat verwendet (Forster). Es ist für die Genauigkeit der Resultates zweckmäßiger, bei derartigen, bakterienreichen Wässern stärkere Verdünnungen anzulegen, als mit feinen Pipetten kleine Mengen abzumessen und direkt mit der Gelatine zu vermischen. Das mit den Wasserproben vermischte Material wird

auf Platten oder in Petrischalen gegossen. Man zieht im allgemeinen die Gelatine dem Agar vor wegen der charakteristischen Wachstumsform der Arten auf diesem Nährboden.

Zu vergleichenden Untersuchungsreihen wird man stets Nährböden von ganz gleicher Zusammensetzung und gleichem Alkaleszenzgrad zu verwenden haben. Speziell ist für die Wasserwerke des Deutschen Reiches eine Vorschrift erlassen, nach der die Gelatine für die Wasseruntersuchung einen gleichen Alkaleszenzgrad besitzt, der auf die Weise erreicht wird, daß zum neutralen Gemisch 1,5 Proz. kristallisierten Natriumkarbonats hinzugefügt wird.

Hesse & Niedner[39], de Gage & Phlebs[29] empfehlen statt der Gelatine den Agar, weil hier eine Verflüssigung durch peptonisierende Arten wegfällt. Die beiden ersten Autoren geben als geeigneten Nährboden für die bakteriologische Wasseruntersuchung einen Nährboden an, der ohne Zusatz von Fleischwasser, Säure oder Alkali folgendermaßen zusammengesetzt ist:

Agar 1,25 Proz.,
Nährstoff Heyden 0,75 Proz.,
dest. Wasser 98 Proz..

Die günstigste Temperatur zur Züchtung für die meisten Arten beträgt ca. 20°, pathogene erfordern jedoch Körpertemperatur.

Die Bebrütung der Platten muß mehrere Tage (bis etwa 8) dauern, da viele Arten nur sehr langsam wachsen. Häufig ist aber bei Gelatineplatten wegen des reichen Gehalts der Wasserproben an verflüssigenden Arten eine baldige Zählung nötig ohne Rücksicht darauf, ob bereits alle wachstumsfähigen Keime zur Entwicklung gekommen sind. (Man kann die Platten noch etwas länger vor der vollständigen Verflüssigung schützen, wenn man die bereits verflüssigte Gelatine absaugt und an die betreffenden Stellen Tropfen von Sublimat oder Kaliumpermanganatlösung bringt.) Bei keimarmen Wässern ist es für die Genauigkeit der Resultate zweckmäßig, wenn man die Gelatineröhrchen nach dem Ausgießen des Nährbodens wieder mit dem Wattepfropf verschließt, in den Brutschrank bringt und die in dem Gelatinerest zur Entwicklung kommenden Keime mit in Anrechnung bringt. Man kann auch den im Röhrchen zurückbleibenden Nährbodenrest mit einer bestimmten Menge sterilen, verflüssigten, gleichartigen Nährmaterials ausspülen.

Zur Zählung der Kolonien dient der Plattenzählapparat von Wolffhügel (Fig. 106). Er besteht aus einer schwarzen, in einen Holz-

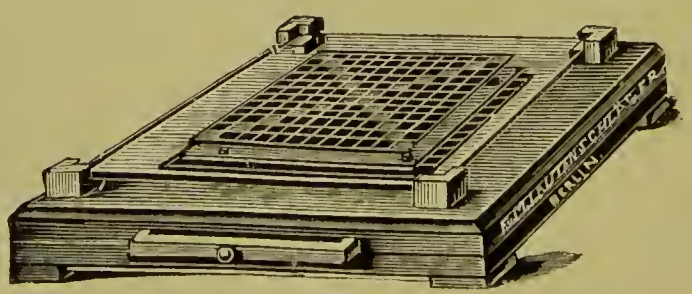


Fig. 106.

rahmen eingelassenen Glastafel, auf welche die zu untersuchende Platte oder Petrischale gelegt wird. Darüber kommt eine zweite Glasplatte, die mit einem Diamanten in Quadratzentimeter ein-

geteilt ist, von welchen die in den Diagonalen liegenden wiederum in je neun kleinere Quadrate geteilt sind. Die Zählung der in den ein-

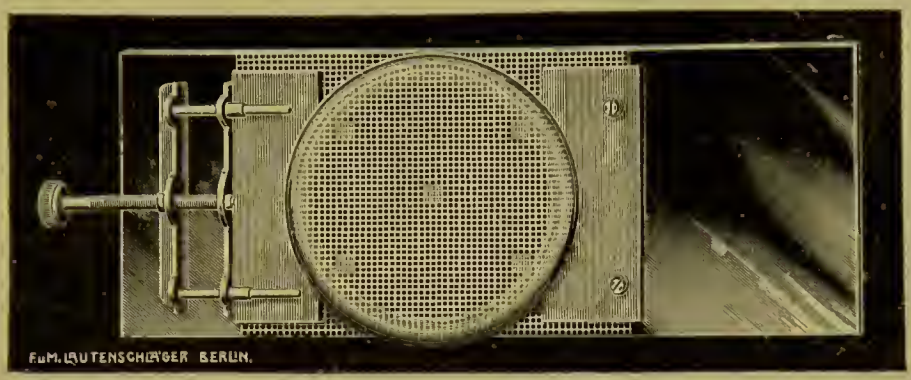


Fig. 107.

zelnen Quadraten sichtbaren Keime erfolgt mit Hilfe der Lupe. Man zählt bei gleichmäßigem Wachstum nur eine Anzahl von Quadraten aus, nimmt das Mittel und multipliziert mit der Anzahl der Quadrate, die die Platte einnimmt. Bei größerer Keimzahl zählt man nur eine Reihe der kleineren Quadrate = $^1/_9$ qcm und berechnet im übrigen in gleicher Weise. Mie [62] quadriert die schwarze Platte des Zählapparates, da bei der Wolffhügelschen Anordnung für Keimzählung in Platten die Parallaxe störend wirkt.

Fig. 108.

Aehnlich verfährt Lindemann, der den Apparat auch sonst technisch vervollkommnet (Fig. 107). Weitere Zählapparate wurden von v. Esmarch [15] und von M. Neisser [68a] (Fig. 108) u. a. angegeben.

Beim Auszählen der Petrischalen berechnet man den Schalenflächeninhalt nach der Formel $r^2\pi$. Da jedoch die Schalen keinen ganz ebenen Boden haben, sondern nach dem Rande zu abgerundet sind, ist es zur genaueren Zählung nötig, nicht einzelne Quadrate, sondern Sektoren auszuzählen. Lafar [53] hat eine Zählplatte konstruiert (Fig. 109), deren Sektoren in Felder von je 1 qcm Inhalt eingeteilt sind. Man zählt einen oder mehrere Sektoren aus und bestimmt mit Hilfe der gefundenen Zahlen die Keimzahl auf der ganzen Petrischale. Der Keimzählapparat von Brudny [5] besteht aus einem mit einer Reißfeder verbundenen Zählwerk, das beim Berühren der Glasfläche über der zu zählenden Kolonie selbständig die Zahl der Kolonien angibt (Fig. 110) (käuflich bei Franz Hugershoff, Leipzig).

Bei einem sehr hohen Keimgehalt der Platten, nach M. Neisser bereits wenn der Keimgehalt des Wassers 1500 Keime übersteigt, ist die Zählung mit dem Wolffhügelschen Apparat nicht exakt durchzuführen. Man zählt alsdann nach M. Neisser mit Hilfe des Mikroskops mehrere Gesichtsfelder, deren Größe man mittels eines Objektmikrometers für die bestimmte Linsenkombination und Tubuslänge ein für allemal bestimmt hat. Aus der Mittelzahl für ein Gesichtsfeld, der bekannten Größe des Gesichtsfeldes und dem Gesamtflächeninhalt der Platten kann man leicht die Zahl der Kolonien berechnen. Die Zählung mit Hilfe des Mikroskops wird durch die Einfügung eines Okularzählnetzes nach Heim (Lehrb.) zwischen die beiden Linsen des Okulars erleichtert. Man hat bei der mikroskopischen Zählung darauf zu achten, daß man durch die ganze Tiefe des Gesichtsfeldes hindurchgeht, damit keine Keime entgehen. Die Zählung mittels des Mikroskops gestattet auch die Berücksichtigung kleinster Kolonien, die bei Anwendung der Lupe nicht sichtbar sind.

Fig. 109.

Fig. 110.

Die Zählung der Rollröhrchen vereinfacht man sich dadurch, daß man die Außenseiten des Röhrchens durch Längs- und Querstriche in Felder einteilt und diese mit einem von v. Esmarch[15] angegebenen Apparat auszählt (siehe oben Fig. 85). Die Berechnung erfolgt bei bekannter Länge und Durchmesser des Röhrchens nach der Formel $l \cdot 2r\pi$.

Dem Verfahren der Keimzählung auf der Platte haften eine Reihe von Fehlern an, die den Resultaten der Zählung mit dieser Methode nur einen relativ bedingten Wert verleihen.

Nicht jede Kolonie ist aus einem Keim hervorgegangen, vielmehr sind häufig die Bakterien in den Substraten, in denen ihre Keimzahl bestimmt werden soll, in schwer trennbaren Verbänden vorhanden, die ihrerseits nur zu einer Kolonie auswachsen können. Sodann entgehen Arten, die auf den gewählten Nährböden und bei den sonstigen

eingehaltenen Züchtungsbedingungen nicht wachsen oder überhaupt nicht künstlich züchtbar sind, der Zählung. Ein weiterer Nachteil des Plattenverfahrens beruht darin, daß es uns nur über die Zahl der entwicklungsfähigen Keime und dies, wie erwähnt, nur bis zu einem gewissen Grad orientiert, während es uns über die Zahl der gleichzeitig vorhandenen abgestorbenen Keime keine Auskunft zu geben vermag.

Methoden, um die Gesamtzahl aller Keime, der lebenden sowohl wie der toten, der künstlich züchtbaren und der nicht auf Nährböden wachsenden zu bestimmen, beruhen auf der direkten Zählung der Keime.

Es ist klar, daß diese Methoden für die Wasseruntersuchung nur bei einem relativ sehr hohen Keimgehalt in Frage kommen können und daher im Vergleich zur Plattenmethode sehr selten in Anwendung gezogen werden. Doch seien sie hier gleich im Anschluß an die Kochsche Plattenmethode geschildert.

Winterberg[108] benutzt zur Keimzählung von Flüssigkeiten oder Bakterienemulsionen im allgemeinen die schon von Hueppe sowie von Lafar empfohlene Thoma-Zeisssche Zählkammer. Zur Verdünnung wird steriles destilliertes Wasser benutzt. Die Berechnung erfolgt nach der Formel $x = \frac{n}{y} \cdot 250000$, wobei x die Keimzahl in einem Kubikzentimeter, y die Summe der gezählten Quadrate und n die Zahl der gezählten Keime bedeutet. Die Methode liefert höhere Werte als die Plattenmethode. Man erhält natürlich keinen Aufschluß über die Art der Keime oder darüber, ob sie noch leben oder nicht.

Klein[48] zählte die Bakterien direkt in gefärbten Präparaten. Die Herstellung der Präparate erfolgt abweichend von dem sonst üblichen Verfahren, indem die Färbung an feuchtem Material erfolgt und Trocknung und Fixierung erst nachher vorgenommen wird. Eine Abspülung der Farbe durch Wasser unterbleibt gänzlich, um Fehler durch Herunterspülen der Bakterien vom Deckglas zu vermeiden. Nach dem Kleinschen Verfahren, daß ausführlich von Hehewerth[36] beschrieben ist, bringt man $^1/_2$ ccm der Flüssigkeit, deren Bakteriengehalt bestimmt werden soll, in ein Uhrschälchen, setzt die gleiche Menge Anilinwassergentianaviolettlösung hinzu und entnimmt mittels einer geaichten Platinöse eine geringe Menge, die auf einem Deckglas gleichmäßig ausgestrichen wird. Nach Lufttrocknung und Fixation wird das Präparat in neutralem Xylolbalsam eingeschlossen. Man zählt 50 Gesichtsfelder mittels des Mikroskopes und berechnet mit Berücksichtigung der Deckgläschengröße, des Inhalts der Platinöse und der Größe des Gesichtsfeldes die Bakterienzahl auf 1 ccm.

Auch bei diesem Verfahren ist die Bestimmung der Keimzahl zahlreichen Fehlern ausgesetzt. In der zum Ausgangsmaterial des Präparates dienenden Flüssigkeit resp. Bakteriensuspension können die Bakterien ungleich verteilt sein. Weiter ist die Aichung einer Oese nicht genau möglich; sodann können Bakterien an der Oese haften bleiben oder bei dem Verstreichen auf dem Deckglas durch Verstäubung verloren gehen.

Die Methode Wrights (zitiert nach Reiter[83]) beruht auf einer Vergleichung der mikroskopisch ermittelten Zahl der Mikroorganismen in der Flüssigkeit mit der Zahl der Blutkörperchen in einem gleichen

Teile normalen Menschenblutes. Durch einfache Rechnung findet man dann die Zahl der Mikroorganismen (x) in 1 ccm Flüssigkeit.

$$x = \frac{\text{Zahl der gezählten Bakterien} \times 5 \text{ Milliarden}}{\text{Zahl der gezählten Blutkörperchen.}}$$

Harrison[34] beschreibt eine Modifikation der Wrightschen Methode, die darin besteht, daß das Blutplasma aus dem Blute entfernt wird. Zu diesem Zwecke wird dem Blute Natriumcitrat zugesetzt, dann die Flüssigkeit zentrifugiert und abpipettiert. Das Plasma wird dann durch gewöhnliche Kochsalzlösung ersetzt, so daß die roten Blutkörperchen in einer Flüssigkeit suspendiert sind, die frei vom bakteriolytischen und agglutinierenden Eigenschaften ist. Die Suspension der roten Blutkörperchen wird auf das ursprüngliche Blutquantum mit Kochsalzlösung aufgefüllt und mit einem abgemessenen Quantum der bakterienhaltigen Flüssigkeit gemischt. Der Flüssigkeit kann vorher zur Färbung der Bakterien etwas Methylenblau zugesetzt werden. Ein Tropfen der Mischung wird auf einen Objektträger gebracht, mit einem Deckglas bedeckt und mit Vaseline umgeben. Darauf werden in einer Anzahl mikroskopischer Felder die Zellen und Bakterien gezählt und aus ihrem Verhältnis die Zahl der Bakterien in der Flüssigkeit geschätzt.

Oram[74] hat einen Apparat zur Zählung der Bakterien unter dem Mikroskop konstruiert, der ein gleichzeitiges Mitzählen von Blutkörperchen gestattet. Der Apparat steht auf dem Fußboden und ist mit zwei Pedalen versehen. Die Hände des Beobachters bleiben frei, die eine zum Handhaben der Mikrometerschraube des Mikroskopes, die andere zum Schieben des Objektträgers. So oft der Beobachter ein Bakterium zählt, drückt er auf das eine, bei Notieren eines Blutkörperchens auf das andere Pedal. Die Bewegungen der Pedale werden auf zwei an der Deckplatte des Tisches angebrachten Zifferblättern registriert. — (Der Apparat, der ein rasches, leichtes und präzises Arbeiten ermöglicht, ist von Alexander & Fowler, Pembroke-Place, Liverpool zu beziehen.)

Nach Zelikov[109] läßt sich die Bakterienmasse in Flüssigkeiten, die stark bakterienhaltig sind (Abwässer etc.), auf kolorimetrischem Wege bestimmen. Das Wesen der Methode beruht auf folgendem: Werden Bakterien mit der Lösung irgendeines Farbstoffes erwärmt, so werden sie gefärbt, da sie einen Teil des Farbstoffes absorbieren. Bei genügender Durchfärbung und gleicher Konzentration der Farbstofflösung muß die Menge des absorbierten Farbstoffes der Bakterienmasse proportional sein. Die Veränderung der Farbstoffkonzentration läßt sich mit dem Dubosc'schen Kolorimeter leicht feststellen und somit auch über die Quantität der Bakterienmasse urteilen.

3. Der Nachweis von bestimmten Mikroorganismen im Wasser.

Kasparek verfährt zum Nachweis bestimmter Keime in einem zu untersuchenden Wasser in folgender Weise: Filtration durch eine Kerze von 5—8 ccm Inhalt von innen nach außen, steriles Zerreiben der Kerze in Reibeschalen (ev. Plattenaussaat), Tierimpfung mit dem Material. (Auch zum Nachweis spärlicher Keime [TB] aus Aufschwemmung des vorher getrockneten und zerriebenen Sputums geeignet.)

Als ein Zeichen von Fäkalverunreinigung wird von vielen Autoren die Anwesenheit von Colibakterien im Wasser betrachtet.

Nach Petruschky & Pusch[78] überwuchern, wenn man fallende Mengen Wasser mit Bouillon bei 37° bebrütet, Coli oder allenfalls Heubacillen event. Bact. alcaligenes alle anderen. Bei ihrem Fehlen ist das Wasser nach der Bebrütung so gut wie regelmäßig klar oder höchstens ganz leicht getrübt. Zur Feststellung des Coligehaltes werden Agarplatten (event. Drigalski) angelegt. Die geringste Menge Wasser, in der sich Coli nachweisen läßt, bezeichnet Petruschky als „Coli-Titer". Ist beispielsweise Bact. coli bei 100 ccm Wasser noch nachweisbar, nicht aber bei 10 ccm, so haben wir einen Titer 100.

Methode von Eijkman[13]: 100, 50 oder weniger Kubikzentimeter Wasser werden mit $^1/_6$—$^1/_8$ ihres Volumens wäßriger Traubenzucker-Peptonlösung (10 Proz. Traubenzucker, 10 Proz. Pepton, 5 Proz. Kochsalz) oder $^1/_{100}$—1 ccm Wasser mit 5—10 ccm einer 1-proz. Zucker-Pepton-Lösung in Gärungskölbchen versetzt und bei 46° bebrütet; Trübung und Gasbildung zeigt die Anwesenheit von Bact. coli an, das sich im Gegensatz zu den meisten anderen Bakterien noch bei 46° vermehrt.

Bulir[5a] modifizierte die Eijkmansche Methode in folgender Weise: Zu 1000 ccm Nährbouillon werden 30 g Mannit gefügt. Ein Teil dieser Bouillon wird mit zwei Teilen des zu untersuchenden Wassers gemischt; diese Mischung, der noch wäßrige Neutralrotlösung zugegeben wird, kommt 12—24 Stunden bei 45—46° in Gärungsröhrchen. Jetzt wird zu 10 ccm der Mischung 1 ccm Lackmustinktur gesetzt: Bei Anwesenheit von Colibakterien zeigt sich Gasbildung, Rötung der Lackmustinktur, Reduktion des Neutralrots, Bildung von Säure. — Fromme[27] empfiehlt eine Anreicherung mit 1 Proz. Dextrosebouillon bei 37°. Venema[101] mischte 5 ccm Wasser mit 50 ccm saurer Bouillon und ließ 16—24 Stunden bei 37° stehen.

Harrison & Vanderleck[35] verwendeten zur Anreicherung Gallensalze. Marmann[59] brachte 5—10 ccm des zu untersuchenden Wassers auf Endoplatten in einen Verdunstungsapparat, der in 30 bis 40 Minuten das Wasser zum Verdunsten brachte (Faust-Heimscher Apparat, siehe Kap. VII). Hierauf werden die Platten in den Brutschrank gestellt.

Federolf[17] benutzt zur Fällung der Colibakterien das von Ficker (s. u.) zum Nachweis der Typhusbacillen in Wasser angegebene Verfahren. Auch Dold[9] gibt dieser Methode den Vorzug.

Houston hat zur Kontrollierung der Londoner Wasserversorgung das folgende Verfahren ausgearbeitet (nach A. Gärtner und teilweise nach H. Dold), zitiert nach Heim (Lehrbuch):

Von Rohwasser werden 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ccm genommen, vom Trinkwasser 100, 10, 1 ccm in Gärungsröhrchen mit Mac Konkey-Lösung (die Lösung von Mac Konkey und Hill besteht aus 2,0 Pepton, 0,5 taurocholsaurem Natrium [Merck], 0,5 Traubenzucker, 5,0 Lackmustinktur [oder 1-proz. frisch bereiteter Lösung von Neutralrot] in 100 destilliertem Wasser) vermischt und bei nicht zu großen Aussaatmengen in Gärungsröhrchen 24 Stunden bei 37° bebrütet. Größere Wassermengen werden mit so viel Stammlösung vermischt, daß die Mischung 0,5 Proz. Traubenzucker enthält.

Wenn Gasentwickelung erfolgt ist, wird 1 Oese auf dem folgendermaßen zusammengesetzten Nähragar ausgesät:

Er erhält in 1 Liter 20 g Agar, 4 g 1-proz. Neutralrotlösung, 5 g taurocholsaures Natrium, 20 g Pepton, 10 g Laktose. Das Neutralrot dient als Indikator für die Säurebildung.

Von einigen hellroten Kolonien wird in je ein Röhrchen mit Glukose-Nährgelatine geimpft und durch Schütteln verteilt; bei Anwesenheit von Colibakterien entwickelt sich Gas. Von hier aus wird auf folgende Nährböden abgeimpft:

Neutralrotagar, Laktose-Lackmusbouillon, Peptonwasser, Lackmusmilch und gewöhnliche Milch. Bact. coli commune erzeugt in Neutralrotagar Fluoreszenz, in Laktose-Lackmusbouillon Säure und Gas, in Peptonwasser Indol, in Lackmusmilch Säure und in Milch Gerinnung.

Von pathogenen Keimen, deren Nachweis im Wasser von hoher Bedeutung ist, kommen die Erreger der Cholera und des Typhus in Betracht.

Zum Nachweis des Cholerabacillus verarbeitet man größere Mengen Wassers, denen man einen Gehalt von 1 Proz. Pepton und $^1/_2$ Proz. Kochsalz gibt (Heim[37], Kutscher[52]). Diese Mischung bringt man in Erlenmeyerkölbchen in den Bruschrank bei 37°, in dem eine Anreicherung der Cholerabacillen stattfindet. Sie sammeln sich vermöge ihres Sauerstoffbedürfnisses und ihrer Beweglichkeit an der Oberfläche der Flüssigkeit. Man entnimmt von ihr nach etwa 12 Stunden mit einer Platinöse geringe Mengen, die zur Plattenaussaat in der bekannten Weise verwendet werden. Von verdächtigen Kolonien werden dann weitere Abimpfungen gemacht. Die Identifizierung der Art wird mit Hilfe der Agglutination und des Pfeifferschen Phänomens vorgenommen.

Die „Anweisung zur Bekämpfung der Cholera" schreibt bezüglich der Wasseruntersuchung vor:

„Mindestens 1 Liter des zu untersuchenden Wassers wird mit 1 Kölbchen (100 ccm) der Peptonstammlösung versetzt und gründlich durchgeschüttelt, dann in Kölbchen zu je 100 ccm verteilt und nach 8- und 12-stündigem Verweilen im Brutschranke bei 37° in der Weise untersucht, daß mit Tröpfchen, welche aus der obersten Schicht entnommen sind, mikroskopische Präparate und von demjenigen Kölbchen, an dessen Oberfläche nach Ausweis des mikroskopischen Präparats die meisten Vibrionen vorhanden sind, Peptonröhrchen, Gelatine- und Agarplatten angelegt und weiter untersucht werden. Zur Prüfung der Reinkulturen Agglutinations- und Pfeiffer-scher Versuch."

„Etwa im Wasser nachgewiesene Vibrionen sind nur dann als Cholerabakterien anzusprechen, wenn die Agglutinierbarkeit eine entsprechende Höhe hat und der Pfeiffersche Versuch positiv ausgefallen ist."

Zur Züchtung der Choleravibrionen aus dem Wasser empfiehlt sich auch der Nährboden von Dieudonné (siehe Kapitel III).

Zur Isolierung des Typhusbacillus aus dem Wasser benützt Rodet[86] eine Vorkultur, die bei 45° gehalten wird, eine eine Temperatur, bei der die meisten gelatineverflüssigenden Bakterien zugrunde gehen, der Typhusbacillus aber lebensfähig bleibt. Aus den Vorkulturen werden dann zum Nachweis der Typhusbacillen Plattenkulturen angelegt.

Vincent[102] benutzte zur Vorkultur Peptonbouillon mit 0,7 Proz. Karbolsäuregehalt, die er mit dem zu untersuchenden Wasser infizierte und bei 42° bebrüten ließ. Nach eventuellen weiteren Uebertragungen waren alle Bakterien bis auf Typhus, Coli und wenige andere Arten vernichtet; unter diesen konnten mittels des Plattenverfahrens die Typhusbacillen leicht isoliert werden.

Péré[76] benutzte zur Vorkultur eine Mischung von 100 Bouillon, 5 Pepton, 1 Karbolsäure auf 1 Liter Wasser. Bebrütung bei 32 bis 36°. Nach eventuell mehreren Uebertragungen werden zur Trennung von Typhus und Coli wie bei den früheren Verfahren Plattenkulturen angelegt.

Kleber[47] konnte nach dem Péréschen Verfahren den Typhusbacillus nicht zuverlässig nachweisen.

Rawitsch & Stscherba[82] verwandten zur Bouillonkultur statt des Karbols α-Naphthol (1 Proz.).

Löffler[56] empfiehlt folgendes Verfahren der Anreicherung: 100 ccm des zu untersuchenden Wassers werden mit 10 ccm sterilisierten Kartoffelsaftes versetzt (etwa gleich 0,1 Prom. Salzsäure) und bei 30° bebrütet. Nach 8—12 Stunden wird eine geringe Menge Flüssigkeit in Kartoffelsaftgelatine übertragen und in Verdünnungen zur Aussaat gebracht. Durch die Vorkultur sind eine Reihe typhusähnlicher Wasserbakterien und zahlreiche gelatineverflüssigende Arten vernichtet.

Ficker & Hoffmann[21] haben als Anreicherungsflüssigkeit mit elektiver Wirkung folgende Nutrose-Koffeinlösung empfohlen:

Auf 1 l Untersuchungswasser sind nötig:

I. Lösung von 10 g Nutrose in 80 ccm sterilem Aqu. dest. (Nutrose löst sich im kochenden Wasserbad in einigen Stunden; nicht filtrieren; nach der Abkühlung den Wasserverlust ersetzen).

II. Lösung von 5 g Koffein in 20 ccm sterilem Aqu. dest. (bei 80° kurz vor der Untersuchung herzustellen).

III. Lösung 0,1 Kristallviolett Höchst in 100 ccm sterilem Aqu. dest. (stets frisch herzustellen). Zur Untersuchung die Lösung II auf 55—60° abkühlen, schütteln, in diese die Lösung I gießen und die Mischung zu 900 ccm Wasser setzen. Unter leichtem Umschütteln langsames Hinzusetzen von 10 ccm der Lösung III. Nach 12—13-stündigem Aufenthalt im Brutschrank weitere Verarbeitung auf Drigalskiagar etc.

Lubenau[58] gibt für den Nachweis von Typhusbacillen im Wasser die folgenden Vorschriften: a) 50 ccm konzentrierter Fickerscher Bouillon (6 Proz. Pepton + 1,6 Proz. NaCl) werden mit Sodalösung neutralisiert, sodann auf 89 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt und sterilisiert; nach dem Erkalten Zusatz von 1 ccm Normalsodalösung, ferner 0,3 g Koffein und 0,0007 g Kristallviolett. Diese Anreicherungsbouillon kommt in hohe Zylinder. Aussaat von 10 ccm Typhuswasser; gut mischen. b) 13 Stunden bei 37° bebrüten, sodann Zusatz von 100 ccm alkalischer Bouillon (Ficker) + 0,6 Koffein (Zusatz von Kristallviolett nur gegebenenfalls beim Abblassen der Bouillon 0,001 bis 0,0014 Proz.); gut mischen. c) Abermals 13 Stunden bebrüten; sodann Aussaat auf Lackmusmolkenagar wie beim Stuhl. d) Weiterer Zusatz von 100 ccm alkalischer Bouillon + 0,9 Proz. Koffein (Kristallviolett 0,0014 bis 0,0021 Proz. nur gegebenen-

falls), abermals 13 Stunden bebrüten und Aussaat von 3 Serien Lackmusmolkenagarplatten.

Ficker[18] erleichtert den Nachweis von Typhusbacillen durch Fällung mit Eisensulfat. Zu 2 l Wasser werden 8 ccm 10-proz. Sodalösung zwecks Alkalisierung gesetzt, ferner 7 ccm einer 10-proz. Eisensulfatlösung; gründliche Mischung. Nach 2—3 Stunden wird zum Bodensatz das halbe Volumen einer 25-proz. Lösung von neutralem weinsauren Kali gefügt und kräftig geschüttelt. Ist die Lösung noch unvollständig, weiterer tropfenweiser Zusatz von Kalilösung. Ein Teil des gelösten Niederschlages wird mit zwei Teilen steriler Bouillon verdünnt; Anlegen von Drigalskischalen. — Dold (l. c.) beschleunigte die Fällung durch Zentrifugieren.

Müller[64] alkalisiert 3 l Wasser mit 12 ccm 10-proz. Sodalösung fügt $10^1/_2$ ccm Ferrisulfatlösung hinzu, rührt gründlich um und filtriert nach einer Stunde. Fällung der Bacillen mit Eisenoxydchlorid. Der Niederschlag wird alsdann auf Drigalskische Platten ausgestrichen.

Auch die folgende Modifikation des Fickerschen Verfahrens, die ein Alkalisieren und Zentrifugieren erübrigt, wird von Müller empfohlen: Zusatz von 5 ccm Liquor ferri oxychloridi zu 3 l Wasser, $^1/_2$ Stunde stehen lassen, Ausstreichen des entstandenen Niederschlages auf Drigalskiplatten.

Schüder[93] gibt zu 2 l Wasser 20 ccm einer 7,75-proz. Natriumhyposulfitlösung, mischt und gibt weiter hinzu 20 ccm einer 10-proz. Bleinitratlösung. Nach 24 Stunden wird der Niederschlag mit 14 ccm einer 100-proz. Natriumhyposulfatlösung geschüttelt. Nach Absetzen der unlöslichen Bestandteile wird von der klaren Lösung 0,2—0,5 ccm auf Drigalskiplatten verstrichen.

Wilson[105] fügt zum Wasser Alaun, zentrifugiert und verstreicht das Präzipitat auf Drigalskiplatten.

Schepilewsky[91] hat ein von Windelbandt[107] angegebenes Verfahren, das auf der Agglutination der Typhusbacillen durch ein spezifisches Serum beruht, für die Untersuchung von Wasser auf Typhusbacillen wie folgt modifiziert: 10—20 ccm des infizierten Wassers werden zu 50 ccm Fleischpeptonbouillon in ein Erlenmeyerkölbchen gegossen. Bebrütung bei 37° 22 Stunden. Filtration durch Watte in ein spitz zulaufendes Zentrifugenröhrchen. Agglutination mit hochwertigem Serum. Bei geringer Flockenbildung 2 Minuten langes Zentrifugieren (800—900 Umdrehungen). Homogenisierung des entstehenden Niederschlages in Kochsalzlösung. (Durchschütteln mit Glaskügelchen) Aussäen der Emulsion mittels eines kleinen Glasstäbchens über einige Platten 3-proz. Agars mit Zusatz von Milchzucker (1,5 Proz.) und Lackmoid (0,04 Proz.).

Altschüler gibt ein dieser Methode sehr ähnliches Verfahren an, das die Zentrifuge unnötig macht: Wasser wird mit Pepton und Kochsalzlösung im Verhältnis 1 und $^1/_2$ Proz. versetzt, 24 Stunden bei 37° gehalten. Zu 10 ccm Wasser, das von den oberflächlichen Randpartien genommen wird, setzt man hochwertiges Typhusimmunserum in eine Menge, die eine Agglutination im Verhältnis 1:50 herbeiführt. Nach 7 Stunden wird der Niederschlag in mit 1-proz. Pepton und $^1/_2$-proz. NaCl-Lösung gefüllte Röhrchen gebracht, die Agglutination durch Schütteln wieder aufgehoben, 24 Stunden bei 37° gehalten und auf Drigalski-Conradi-Agar ausgestrichen.

Hagemann[32] kombinierte die Schüdersche Fällungsmethode mit dem Agglutinationsverfahren von Schepilewsky.

Remy[84] isoliert den Typhusbacillus durch Säurezusatz zum Nährboden, Wilson[106] fügt zu 1 l Wasser 10 ccm Bouillon und evaporiert unter geringem Druck. (Weitere Untersuchungsmethoden siehe diesen Abschnitt Kapitel III und dieses Handbuch unter Typhus.)

Literatur zum IV. Kapitel.

1. Altschüler, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, H. 9, 1903.
2. Beer, A., Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 39.
3. Bertarelli, E., Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 33, Nr. 9, 1903.
4. Bronstein, ebd., Bd. 40, Heft 4, 1906.
5. Brudny, ebd., Bd. 57, Heft 5, 1911.
5a. Bulir, Arch. f. Hyg., Bd. 62, 1907.
6. Conradi, Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 2.
7. Cornet, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 5, 1889.
8. Czaplewski, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 11.
9. Dold, H., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 66, Heft 2, 1910.
10. Dschunkowsky, Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, Heft 1, 1904.
11. Dschunkowsky und Luhs, ebd., Bd. 38, Heft 3, 1905.
12. Eberbach, O., Hyg. Rundsch., Bd. 1, 1891.
13. Eijkman, Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, Heft 5, 1904.
14. Emmerich, Arch. f. Hyg., 1883.
15. v. Esmarch, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 1, 1886.
16. — ebd., Bd. 20, 1895.
17. Federolf, Arch. f. Hyg., Bd. 70, Heft 4, 1909.
18. Ficker, Hyg. Rundsch., 14. Jahrg., Nr. 1, 1904.
19. — Zeitschr. f. Hyg., Bd. 22, 1896.
20. — Arch. f. Hyg. u. Inf., Bd. 69, 1909.
21. Ficker & Hoffmann, ebd., Bd. 49, 1904, u. Hyg. Rundschau, Bd. 14, 1904.
22. Flügge, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 25, 1897.
23. Forster, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, Heft 5, 1906.
24. — Lancet, 1905, Vol. 1, June 17.
25. Frankland, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 3, 1887.
26. Fränkel, C., ebd., Bd. 2, 1887.
27. Fromme, ebd., Bd. 65, Heft 2, 1910.
28. Gärtner, A., ebd., Bd. 67, Heft 1, 1910.
29. de Gage, M. & Phelps, E. B., Repr. from the proceed. of the 29. ann. meet. of the Americ. publ. health assoc., 1901, Columbia.
30. Gage, George Schoard, Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, Heft 2, 1908.
31. Galli-Valerio, ebd., Bd. 54, 1910.
32. Hagemann, ebd., Bd. 33, Heft 9, 1903.
33. Hahn, M., ebd., Bd. 51, Heft 2, 1909.
34. Harrison, W. S., Journ. of the royal army med. corps, Vol. 4.
35. Harrison & Vanderleck, Centralbl. f. Bakt., Bd. 51, Heft 5, 1909.
36. Hehewerth, Arch. f. Hyg., Bd. 39, 1901.
37. Heim, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.
38. Hesse, Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 2, 1884.
39. Hesse & Niedner, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 29, 1898 u. Bd. 53, 1906.
40. Heymann, ebd., Bd. 30, 1899.
41. Hilgermann, Klin. Jahrb., Bd. 22, Heft 2.
41a. Hilgermann, ebd., Bd. 20, 1909.
42. — Arch. f. Hyg., Bd. 59, Heft 4, 1906.
43. Jehle, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 48.
44. Kammerer & Giacomi, Arch. f. exper. Pathol., 1886.
45. Kaspareck, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 32, Nr. 5, 1902.
46. Kathe, Hans, ebd., Bd. 49, Heft 2, 1909.
47. Kleber, A., ref. Hyg. Rundsch., Bd. 5, 1895.
48. Klein, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 27, 1900.
49. Klodnitzky, ebd., Bd. 58, Heft 4, 1911.
50. Koch, R., Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt., Bd. 1, 1881.
51. Kraus, R., Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 32, Nr. 6, 1902.
52. Kutscher, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 19/20, 1895.

53. Lafar, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 15, 1894.
54. — Technische Mykologie, Jena 1897.
55. Laschtschenko, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 30, 1899.
56. Löffler, Das Wasser u. d. Mikroorg. Weyls Handb. d. Hyg., Bd. 1, 1896.
57. van Loghem, Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, Heft 1, 1908.
58. Lubenau, C., Hyg. Rundsch., Jahrg. 17, 1023, 1907.
59. Marmann, Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, Heft 2, 1904.
60. Mehring, Lehrb. d. inn. Med., Jena, G. Fischer, 1911.
61. Meyer, E., Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 32, Nr. 11, 1902.
62. Mie, Hyg. Rundsch., Bd. 4, 1898.
63. Miquel, Ann. de l'observ. de Montsouris, 1879, 1885, 1886.
64. Müller, O., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 51, Heft 1, 1905.
65. Müller, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 41.
66. Müller & Gräf, ebd., 1906, Nr. 2.
67. Mulzer, Diagnose der Syphilis, Berlin, J. Springer, 1910.
68. Neisser, M., Zeitschr. f. Hyg., Bd. 20, 1895.
68a. Neisser, M., Arb. a. d. Kgl. Inst. f. exp. Ther. zu Frankfurt a. M., 1908, Heft 4.
69. Neufeld, ebd., Bd. 30, Heft 3, 1899.
70. Neumann, G., Arch. f. Hyg., Bd. 59, Heft 2, 1906.
71. Noeggerath & Staehelin, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 31.
72. Oberndorffer, Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol. in München, 7. Febr. 1905; ref. Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 16.
73. Ohlmüller, W. & Spitta, O., Die Untersuchung und Beurteilung des Wassers. Berlin (J. Springer) 1910.
74. Oram, W. C., Brit. med. journ., Vol. 1, 1534, 1906.
75. Orsi, Giovanni, Arch. f. Hyg., Bd. 68, Heft 1, 1908.
76. Péré, M., Annal. Past.. T. 5, 1891.
77. Petri, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 3, 1887.
78. Petruschky & Pusch, ebd., Bd. 43, 1903.
79. Pfuhl, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 8, 1890.
80. Ploeger, A., Münch. med. Wochenschr., 1910, Nr. 48.
81. Prall, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 18.
82. Rawitsch-Stscherba, ref. Baumgartens Jahresber., Bd. 8, 1892.
83. Reiter, H., Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 52.
84. Remy, L., Annal. Past., 1901, 145.
85. Rille & Vockerodt, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 34.
86. Rodet, ref. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1889.
87. Rodella, Antonio, Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, Heft 2, 1904.
88. Rosenberger, ebd., Bd. 50, Heft 3, 1909.
89. Saito, Arch. f. Hyg., Bd. 63, Heft 3, 1907.
90. Schaudinn, F. & Hoffmann, E., Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 18.
91. Schepilewsky, Centralbl. f. Bakt., Bd. 33, Heft 5, 1903.
92. Schnitter, Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 36.
93. Schüder, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 42, 1903.
94. Schütz, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 15.
95. Schottelius, M., ebd., 1907, Nr. 11.
95a. Schumburg, Deutsche med. Wochenschr., 1897, Nr. 29.
95b. Sclavo, ref. Centralbl. f. Bakt., Bd. 15, S. 507, 1894.
96. Sehlen, Fortschr. d. Med., 1884.
97. Senft, E., Mikrosk. Unters. d. Wassers, J. Lafár, Wien 1905.
98. Somani, Arch. f. Dermatol. u. Syph., 1909.
99. Stäubli, Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 50.
100. Straus & Würz, Annal. Past., 1888.
101. Venema, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, Heft 4, 1906.
102. Vincent, Annal. Past., 1890.
103. Weber, A., Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 47.
104. Wiens, ebd., 1907, Nr. 32.
105. Wilson, Journ. of Hyg., Oktober 1905.
106. — Brit. med. Jonrn., 18. Mai 1907.
107. Windelbandt, Russky Wratsch, 1902, Nr. 19.
108. Winterberg, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 29, 1898.
109. Zelikov, J., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 42, H. 5, 1906.

V. Kapitel.

Die Methoden des Tierversuchs in der Bakteriologie.

Die Methoden des Tierversuchs erheischen hier nur insofern eine besondere Besprechung, als sie von den sonst gebräuchlichen tierexperimentellen Methoden abweichen.

A. Die Zwecke des Tierexperiments.

Wir verfolgen mit dem bakteriologischen Tierexperiment im wesentlichen einen doppelten Zweck. Einmal dient die Verimpfung unreinen Materials, in dem eine für das Versuchstier infektiöse Bakterienart vorhanden ist, dazu, diese durch eventuell mehrfache Tierpassage rein zu züchten. Wir benutzen so gewissermaßen das Tier als den optimalen, elektiven Nährboden, auf dem die zu züchtende Art schließlich andere verdrängt. Durch Einspritzen von tetanushaltiger Erde gelingt es z. B. mit dieser Methode relativ leicht, den Tetanusbacillus rein zu gewinnen. Bei der ersten Tierpassage finden sich neben ihm wohl noch andere Bakterien, deren Zahl aber bei weiteren Impfungen mehr und mehr abnimmt, bis sie schließlich ganz verschwinden.

Der wichtigste Zweck des Tierexperiments aber ist der, festzustellen, inwieweit eine bei einer Krankheit gezüchtete Bakterienart für die gleiche Tierspecies und für andere, näher oder ferner stehende infektiös ist. Es ist natürlich ohne weiteres klar, daß man Schlüsse aus Verimpfungen, besonders auf andere Species, nur beschränkt ziehen darf, zumal man nur selten die Verhältnisse schaffen kann, die dem natürlichen Infektionsmodus, was den Weg der Infektion oder die Dosis des Infektionsmaterials anlangt, entsprechen.

B. Instrumente für den Tierversuch.

Käfige zum Aufbewahren der Versuchstiere: Die Käfige sollen bequem gereinigt werden können, die Tiere müssen leicht zugängig sein; für infizierte Tiere empfehlen sich Einzelkäfige, die sterilisiert werden können, für Kaninchen Käfige aus Blech und Draht (Fig. 111), für Meerschweinchen irdene Töpfe mit Drahtdeckel (Fig. 112), für Mäuse sind Glasgefäße (Fig. 113) gebräuchlich, die zweckmäßig nicht an zu hellen Orten gehalten werden sollen. Da Glas jedoch ein guter Wärmeleiter ist und die Mäuse gegenüber Temperaturschwankungen sehr empfindlich sind, auch Belichtung schlecht vertragen, empfehlen sich zur Aufbewahrung größerer Mengen Holzkäfige mit Drahtgitter. Es ist darauf zu achten, daß Mäuse (ebenso Ratten) die eingegangenen auffressen und deshalb die Tiere möglichst einzeln zu halten sind. Für größere Serien sind die Einzelmauskisten nach Friedberger (F. M. Lautenschläger) zu empfehlen.

Der Affenkäfig nach M. Neisser, Fig. 114 (beschrieben von Gins[18]) auch für sonstige bissige Tiere geeignet, hat eine mit von außen zu bedienendem Schieber versehene, verstellbare Zwischendecke, die den ganzen Querschnitt einnimmt und für gewöhnlich unter dem Deckel fixiert ist.

Zur Reinigung des Käfigs kommt sie in die Mitte und der Affe wird bei geöffnetem Schieber in den oberen Halbkäfig getrieben.

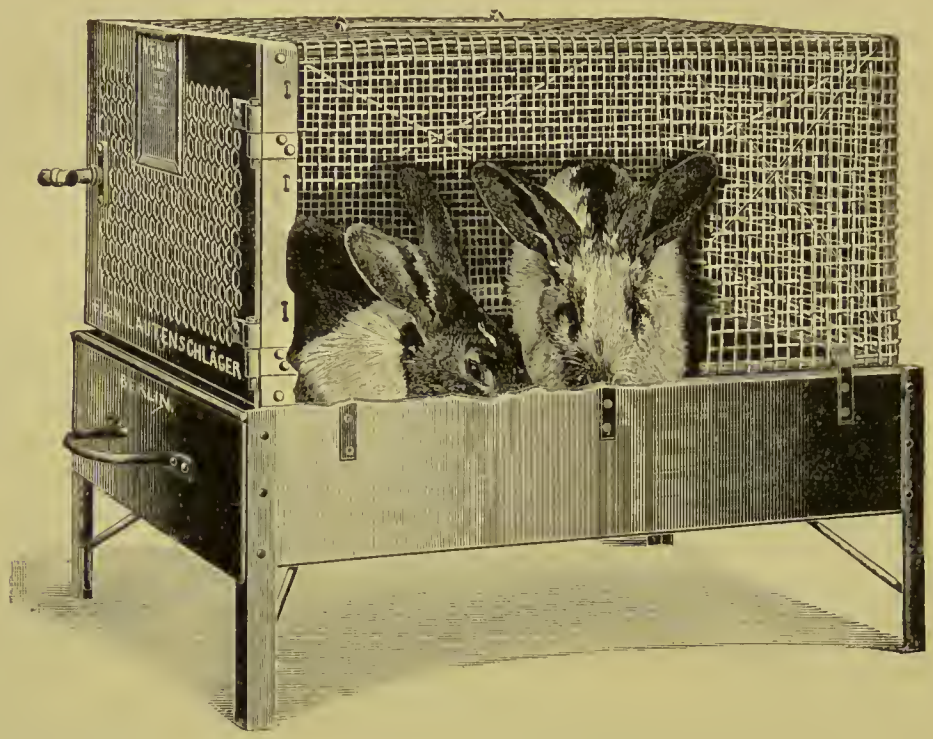


Fig. 111.

Der eigentliche obere Abschlußdeckel hat in der Mitte eine Klappe, über deren Oeffnung eine Netztasche gestülpt werden kann, in die der im Oberkäfig befindliche Affe hineinkriechen muß, wenn der verschiebbare Zwischendeckel weiter nach oben geführt wird. Auf diese Weise ist das Tier leicht zu fangen.

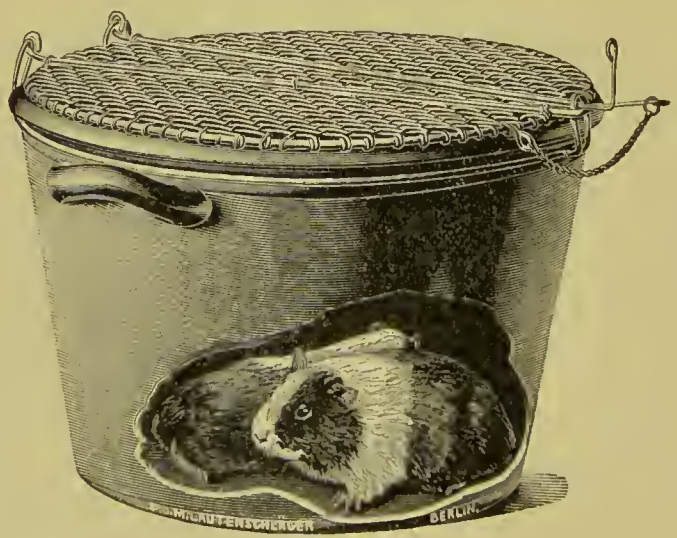


Fig. 112.

Belfanti benutzt als Käfig für Meerschweinchen und Kaninchen Endstücke von großen Kanalisationsröhren, die vorn und hinten mit Drahtgittertüren versehen und von beiden Seiten zugängig sind.

Diese Röhren in mehreren Stufen aufeinandergestellt und durch Zement befestigt, nehmen wenig Platz in Anspruch und sind billig.

Fig. 113.

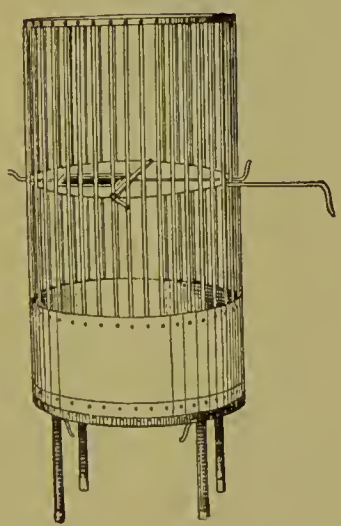


Fig. 114.

Fig. 115.

Operationsbretter zum Aufspannen der Tiere existieren in zahlreichen Modellen. Für größere Tiere, wie Hunde, ist der Halter von Malassez (Fig. 115) sehr geeignet. Für kleinere Tiere, wie Kaninchen und Meerschweinchen, ist das Operationsbrett nach Tattin oder das von der Firma Lautenschläger gebaute (Fig. 116)

empfehlenswert. Letzteres ist ganz aus Metall, mit verstellbarem Kopfhalter und mit an Schienen verstellbaren Beinhaltern versehen.

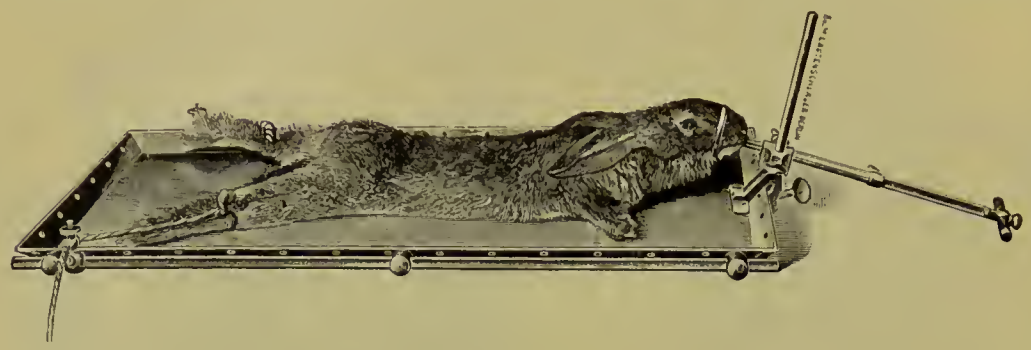


Fig. 116.

Hierdurch ist es möglich, Tiere jeder Größe bequem und sicher fixieren zu können.

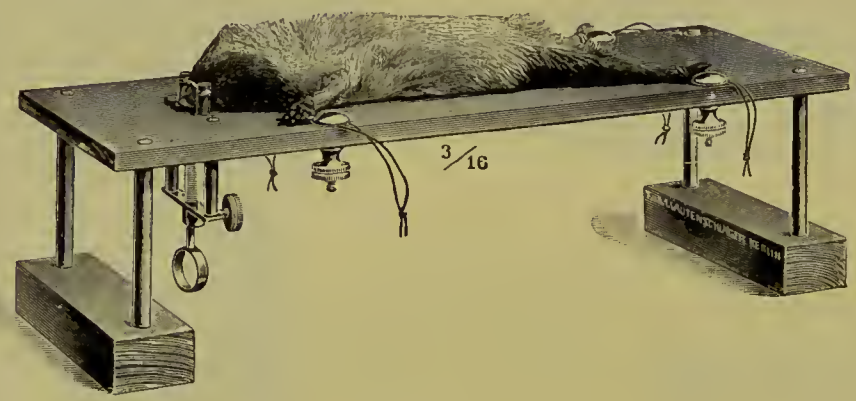


Fig. 117a.

Das Tierbrett von Friedberger (Fig. 117) ist speziell zum Aufspannen von Meerschweinchen bestimmt. Das Tier wird so auf den Rücken gelegt, daß der Metallbügel *B* in die Schnauze zu liegen kommt.

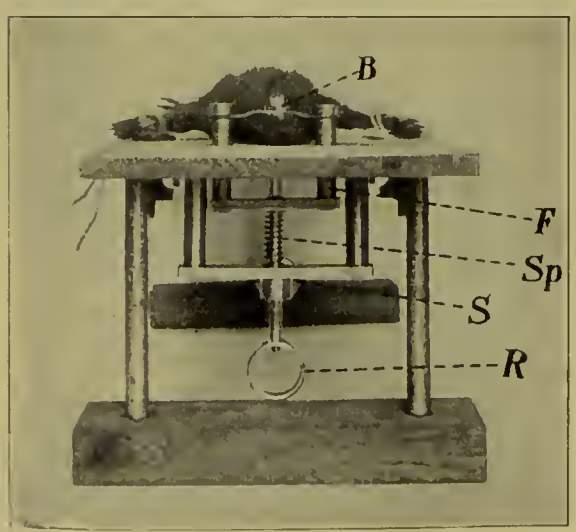


Fig. 117b.

Nachdem man durch Ziehen an dem Ring *R* dem Bügel, der durch eine Spiralfeder *Sp* federnd angebracht ist, die gewünschte Lage gegeben hat, erfolgt seine Fixierung mittels der Schraube *S*. — Die Beine des Tieres werden vorher mit Bindfaden an den Schrauben *E* zunächst locker befestigt, nach der Fixierung des Kopfes fest angezogen.

Klebs [31] immobilisierte Meerschweinchen dadurch, daß er sie unter Freilassung der Bauchwand mit einer Flanellbinde umwickelte. An der-

artig fixierten Tieren konnte er ohne Assistenz Injektionen in den Darm vornehmen.

Voges[72] hat zur Ruhigstellung von Meerschweinchen einen sehr einfachen Halter angegeben (Fig. 118). In eine zylindrische Blechbüchse mit seitlichem Schlitz und Siebboden wird ein Meerschweinchen hineingesteckt. An dem immobilisierten Tier können Injektionen, Temperaturmessungen und dergleichen vorgenommen werden.

Für Ratten hat Curt Müller[45] einen Halter konstruiert. Die Ratte wird im Nacken mit einer Kornzange gefaßt und diese sowie das Schwanzende des Tieres mittelst federnder Klemme auf ein Metallbrett aufgespannt. Alsdann werden die Füße des Tieres mit Klemmen seitlich an das Brett fixiert.

Fig. 118.

Woithe[74] hat eine Vorrichtung zum Befestigen und Aufspannen wilder Ratten angegeben. Der Apparat, der bei der Firma Lautenschläger gebaut wird, gestattet ein gefahrloses Arbeiten, macht eine Assistenz entbehrlich und ist sterilisierbar.

Kitasato hat einen dem Müllerschen ähnlichen Halter für Mäuse konstruiert (Fig. 119). Die Fixation des Tieres auf den Metalltisch erfolgt durch zwei federnde Klemmen, die am Schwanzende und im Nacken angelegt werden. Der Tisch ist durch ein Kugelgelenk drehbar und läßt sich so in jeder Lage feststellen. Sehr zweckmäßig ist für mittelgroße und kleine Tiere das Universaloperationsbett nach Cowl[9] (F. M. Lautenschläger). Das Brett besitzt zahlreiche Löcher, in die je nach der Größe des Tieres weiter voneinander entfernt oder näher zusammen die Beinhalter und der für verschiedene Tierarten auswechselbare Kopfhalter gesteckt werden.

Auf diese Weise ist es möglich, unter Benutzung nur eines Brettes, die gebräuchlichsten mittelgroßen Laboratoriumstiere zu fixieren; nicht nur Säuger, sondern auch Vögel, Fische usw.

Fig. 119.

Handelt es sich um kleine Operationen am Kopfe des Kaninchens, wie eine Blutentnahme oder intravenöse Injektion, so ist der nebenstehende Apparat (Fig. 120) zu empfehlen, der jede Assistenz entbehrlich macht.

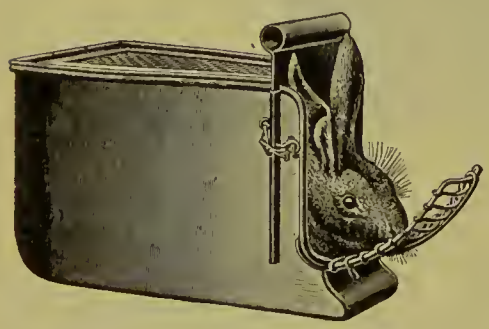


Fig. 120.

Für die Blutentnahme und ebenso bei einiger Uebung für die intravenöse Injektion kommt man auch ohne Assistenz und ohne besondere Apparate gut aus, wenn man das Kaninchen an der Brustwand mit dem linken Arm so fixiert, daß das Hinterteil in die Achselhöhle zu liegen kommt. Das Tier ist dann genügend ruhig gestellt und beide Hände sind frei.

Zum Wiegen der Tiere benutzt man eigens für diese Zwecke hergestellte Wagen, die ein Entspringen des Tieres verhindern.

Von **Spritzen** werden meist die nach dem alten Pravazschen Typus verwendet: der Stempel kann mittelst Schraube am Stempelkopf so verstellt werden, daß der Stempelschaft absolut dicht an die Glaswand sich anschmiegt. Auf diese Weise wird ein Zurücktreten der Flüssigkeit hinter den Stempel vermieden. Um bei Undichtigkeiten des Stempels eine Infektion des Operateurs durch nach hinten tretende Flüssigkeit sicher zu vermeiden, hat Glücksmann den Spritzenzylinder hinter dem Stempel hohlkehlenartig erweitert. Die

Kochsche Spritze (Fig. 121) ist ganz ohne Stempel hergestellt. Am Ende des Glasrohres, an dem vorne die Kanüle angebracht, ist, befindet sich ein Gummiballon. An seiner hinteren Seite ist eine kleine Oeffnung, die beim Ansaugen der Flüssigkeit mit dem Daumen verschlossen zu halten ist. Nachdem mit einem Metallhahn die Kommunikation zwischen Spritze und Ballon gesperrt ist, kann der Finger weggenommen werden. Das Entleeren der Spritze erfolgt nach Oeffnen des Hahnes durch Zusammendrücken des Ballons, dessen Oeffnung dabei verschlossen zu halten ist. Die Spritze von Strohschein besteht aus einem Rohr mit Graduierung, das vorne auf einem Konus aufgesetzt die Kanüle trägt und hinten eine kleine Oeffnung hat. Auf das graduierte Rohr ist ein weiteres, hinten geschlossenes, reagenzglasähnliches Glasrohr aufgesetzt, das mit Hilfe einer Gummidichtung auf dem ersten luftdicht gleitet und so als Stempel wirkt.

Bei der Inghillerischen Spritze sind, um eine Beschmutzung und Infektion des Stempels durch den aufgezogenen Spritzeninhalt zu vermeiden, Luftkammer und Flüssigkeitsbehälter durch zwei Einschnürungen des Glasrohres, welche eine Erweiterung umschließen, voneinander abgesetzt. Die Luftkammer hat weiteres Kaliber. Die Injektionsnadel wird dem Glasrohr aufgeschliffen. Der Spritzenstempel ist in der Längsrichtung durchbohrt. Bei der Injektion wird die äußere Mündung mit dem Daumen verschlossen. Ist sie offen, so kann man den Stempel ohne Schaden während der Injektion hochziehen, um nachher stärkeren Druck auszuüben, oder herunterschieben, um erneute Aspiration zu ermöglichen.

Fig. 121.

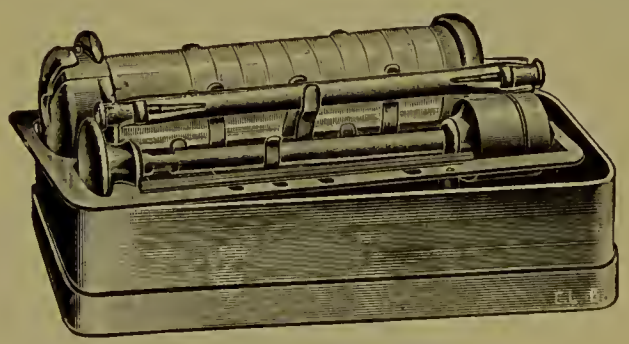


Fig. 122.

Die Luersche Spritze, die sich für bakteriologische Zwecke am besten eignet, ist völlig aus Glas hergestellt, so daß ein Undichtwerden des Stempels ganz ausgeschlossen ist. — Die Rekordspritze (Fig. 122) besteht aus Glasrohr und mit konischer Spitze versehenem eingeschliffenen Metallstempel. Zum Sterilisieren kann sie auseinandergenommen werden. Durch die Form des Stempels lassen sich Luftblasen in der Spritze vermeiden und es eignet sich diese Spritze daher besonders für die intravenöse Injektion.

Zur intraperitonealen Injektion benützt Friedberger[14] eine Spritze ohne Ansatz mit ca. 2 cm langem, dünnem Auszug, dessen Oeffnung abgeschrägt, aber stumpf geschliffen ist.

Zur Injektion größerer Flüssigkeitsmengen dient u. a. ein von Ehrlich angegebener Apparat (Fig. 123). Er besteht aus einem sterilisierbaren Glaskolben mit zwei Oeffnungen für die zu injizierende

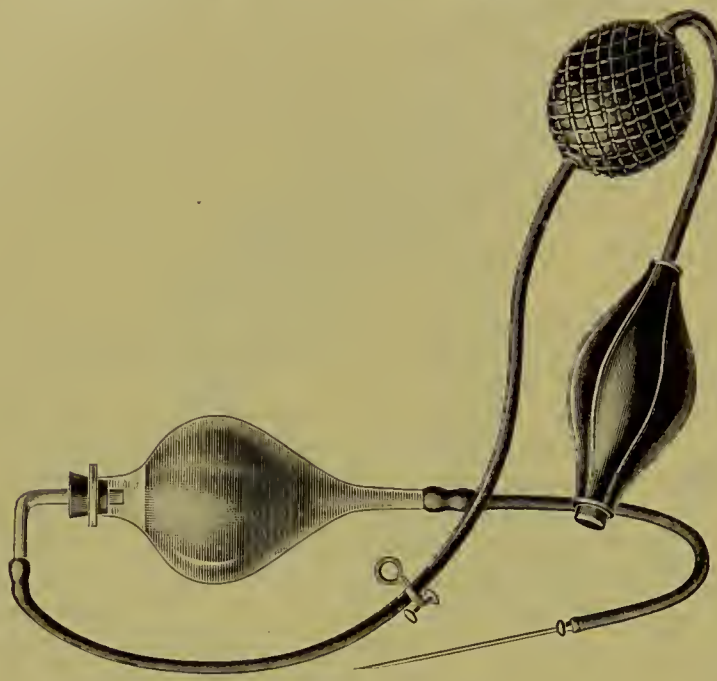


Fig. 123.

Flüssigkeit. In die obere Oeffnung wird mittels eines durchbohrten Pfropfens ein Gebläse eingesetzt; über die untere ist ein Gummischlauch gestülpt, der die Kanüle trägt. Abschluß durch einen Quetschhahn.

Auch mit Gummischlauch und Quetschhahn armierte einfache Büretten lassen sich für derartige Zwecke verwenden.

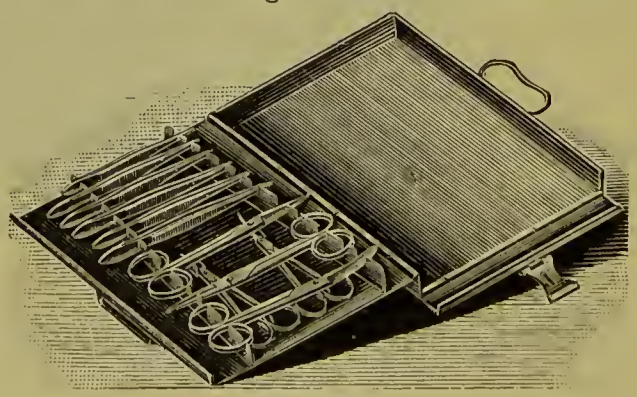


Fig. 124.

Das für bakteriologische Untersuchungen gebräuchliche **Instrumentarium** ist im übrigen das in der Chirurgie und der experimentellen Physiologie übliche. Ein besonderes Besteck für bakteriologische Zwecke in einer Metallschale sterilisierbar ist von R. Pfeiffer zusammengestellt (Fig. 124).

Zu genauen vergleichenden **Temperaturmessungen** eignet sich das kleine Thermometer von Weichardt, das ganz in den Anus versenkt wird. Friedberger hat ein Thermometer (Fig. 125) angegeben, das nur bis genau zu der gleichen Tiefe in den Anus einführbar ist und dadurch für vergleichende Messungen sehr geeignet erscheint. Das Thermometer steckt fest in einer Metall- oder Glasscheibe, bis zu der es in den After eingeführt wird. Die Scheibe, die nach unten leicht konkav gebogen ist, legt sich gut an die Analöffnung an. (Med. Warenhaus, Berlin.)

Fig. 125.

Die Kennzeichnung der geimpften Tiere geschieht durch Färben oder durch besondere Ohrmarken mit Nummern. Man kann sich diese selbst herstellen, indem man die zum Verschluß von Musterbeuteln üblichen Metallklammern benützt und auf der Oberseite mit einer Stanze die Buchstaben bzw. Nummern einschlägt, Hierzu hat Friedberger ein einfaches Stanzbrett angegeben (Fig. 126). Es läßt sich auf diese Weise außer einem Buchstaben eine dreistellige Zahl anbringen. Die Klammern werden den geimpften Tieren (Kaninchen, Meerschweinchen) durch die Ohren gestochen und die beiden Enden umgebogen. Eine Verwechslung von Tieren ist auf diese einfache Weise unmöglich.

Fig. 126.

Bei Versuchen, die eine genaue zeitliche Beobachtung erfordern, empfiehlt sich der Gebrauch einer Stempeluhr, bei der die genaue Zeit fortlaufend durch einen Kautschukstempel in das Protokoll eingetragen werden kann.

C. Die Methoden der künstlichen Infektion.

Bei den Methoden der künstlichen Infektion sucht man wenigstens in der Mehrzahl der Fälle im Experiment den Modus der spontanen Infektion nachzuahmen. Man wird also Erreger, deren Ort des natürlichen Vorkommens der Darmkanal ist, in diesen einbringen, Bakterien, die sich z. B. in den Lungen finden, dort injizieren. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle aber wird die Injektion in die Haut oder in die Blutbahn wegen der bequemen Ausführbarkeit bevorzugt, obwohl diese Art der Applikation im wesentlichen nur für Wundkrankheitserreger dem natürlichen Weg der Infektion entspricht.

Um bei der Infektion mit Reinkulturen das Virus vorher zu dosieren, kann man mit der Platinöse entnommene Mengen abwiegen.

Nach Petruschky[53] verfährt man dabei so, daß man die Kulturmasse in ein tariertes Reagenzglas bringt und auf der chemischen Wage wiegt. Eine Fehlerquelle durch Wasserverdunstung soll nach Petruschky nicht vorhanden sein, da die bei der kurze Zeit dauernden Wägung verdunstenden Wassermengen sich an den Innenwänden des horizontal liegenden Reagenzglases kondensieren.

Sobernheim[63] schwemmte den Inhalt eines Agarröhrchens in 10 ccm Bouillon auf und nahm einen aliquoten Teil. Bei gleicher Agarfläche und gleichen Wachstumsbedingungen läßt sich auch mit dieser Methode eine hinreichend genaue Dosierung ermöglichen.

Einfacher ist das Verfahren von R. Pfeiffer[54], der sich eine bestimmte Oese („Normalöse") von 2 mg Fassungsgewicht für seine Versuchsreihen herstellte und diese immer in gleicher Weise mit der Kulturmasse füllte. Die Normalöse Bakterienmaterial wird in Bouillon oder Kochsalzlösung aufgeschwemmt und in entsprechender Verdünnung verimpft.

Bei manchen Versuchen sollen die zur Infektion dienenden Bakterien wohl dem Einfluß der Körpersäfte, nicht gleichzeitig aber dem der zelligen Elemente ausgesetzt sein. Man schließt sie daher vor dem Einbringen in den Tierkörper in Substanzen ein, die wohl für die ersteren, aber nicht für die letzteren durchgängig sind. Metschnikoff empfahl zu dem Zweck die feinen Membranen, die den Markraum des Schilfes (Fraemites communis) auskleiden. Stückchen dieser Membranen werden mit den Bakterien beschickt, sackartig zugebunden und den Tieren unter die Haut oder in eine Körperhöhle eingebracht. Petruschky[52] verwandte Stücke von getrocknetem Froschdarm, auch Säckchen aus Collodium elasticum eignen sich zum selben Zweck.

Harris[21] fertigt Kollodiumsäckchen nach folgendem Verfahren an: Ein Glasröhrchen, 4 cm lang, von 3 mm Durchmesser, wird am unteren, vorher in der Flamme geglätteten Ende erwärmt und in eine Gelatinekapsel eingeschmolzen. Nach dem Erstarren wird an der Einschmelzstelle ein Kollodiumwall angelegt. Dann wird das Röhrchen herausgezogen, der die untere Mündung verschließende Gelatinepfropf entfernt und das Röhrchen wieder eingefügt. Nunmehr wird die Kapsel, indem man sie am Röhrchen hält, in Kollodiumlösung so tief eingetaucht, daß diese die Kapsel bis 1 cm weit überragt, so daß auch der untere Röhrchenteil einen Ueberzug erhält. Herausnehmen der Kapsel und Drehen in horizontaler Lage unter leichtem Blasen, bis das Kollodium in dünnem, gleichmäßigem Ueberzug erstarrt ist. Nach dem Trocknen wird an der Einfügungsstelle des Glasrohrs in der Mitte und am Boden der Ueberzug verstärkt und abermals getrocknet. Einfüllen von Bouillon mittels einer Pasteurschen Pipette. Einlegen der Kapsel in ein Reagenzglas mit Bouillon und sterilisieren im Autoklaven 5 Minuten lang bei 120°. Man erhält so durch Vermischung der schmelzenden Gelatine mit der Bouillon in der Kapsel einen sterilen Gelatinenährboden. Soll die Gelatine aber ganz entfernt werden, so wird die Kapsel zunächst in heißes Wasser gebracht und die geschmolzene Gelatine mit Wasser ausgespült. Sterilisation in Bouillon wie vorher. (Zur Prüfung des Dialysierungsvermögens des benutzten Kollodiums kann man die Säckchen nach Entfernung der Gelatine mit Magnesiumsulfatlösung füllen gegen destilliertes Wasser dialysieren und in diesem das Salz nach einiger Zeit nachweisen.) Zur Impfung wird etwas von der Bouillon aus der

Kapsel herauspipettiert, die bakterienhaltige Flüssigkeit eingebracht und die Glasröhre vorsichtig nahe der Einsatzstelle der Kapsel abgeschmolzen.

Frost[15] gibt folgendes Verfahren zur Herstellung von Kollodiumsäckchen (für intraperitoneale Impfung) an. In ein schmales Reagenzglas mit rundem Boden wird dickes Kollodium gegeben, so hoch wie das Säckchen lang werden soll. Es wird dann entlang einer Seite des Gläschens in ein zweites, aus diesem in ein drittes gegossen und sofort, bis das Material aufgebraucht ist. Auch kann durch die Rollmethode das Kollodium zur gewünschten Höhe in das Gläschen gebracht werden. Die Röhrchen werden dann, Mündung abwärts, schräg auf die Kante der Gießfläche zum Abtropfen hingestellt. Es bildet sich je nach der Konzentration des Kollodiums eine verschieden dicke Haut auf der Glaswand im Röhrchen. 10-proz. Kollodium in gleichen Teilen Alkohol und Aether gelöst, gibt für gewöhnliche Zwecke ausreichend dicke Häutchen. 3-proz. Kollodium kann für chemische Zwecke benutzt werden. Das Kollodium trocknet an der Luft wenige Minuten bis einige Stunden. Wenn der gebildete Kollodiumsack genügend lufttrocken geworden ist, springt er von der Glaswand ab. Zur Sterilisation werden die Säckchen zu $^1/_4$—$^3/_4$ mit Bouillon oder einer anderen Nährflüssigkeit gefüllt und in ein Röhrchen mit dieser Flüssigkeit versenkt. Dabei werden die Säckchen durch die eingetrocknete Zunge, welche beim Ausgießen des Kollodiums entstand, gehalten. Diese Zunge wird oben an der Mündung des Reagenzglases umgebogen und durch den Wattestopfen fixiert, desgleichen die Fadenenden eines locker um das Säckchen gelegten chirurgischen Knotens, welcher nachher zum Abschluß der Säckchen zugezogen werden soll.

Empfehlenswert ist auch folgende Methode (Friedberger): Reagenzgläser werden je nach der beabsichtigten Länge der Kollodiumsäckchen in verflüssigtes Paraffin eingetaucht. Nach dem Erstarren des Paraffins Eintauchen in flüssiges Kollodium, das nicht bis zur Paraffingrenze heranreichen darf. Ist dieses erstarrt, so taucht man den unteren Teil der Reagenzgläser in heißes Wasser, in dem sich die Kollodiumsäckchen leicht ablösen. Entfernen der Paraffinreste durch Einbringen in Xylol.

Narkose ist bei bakteriologischen Eingriffen i. R. nicht erforderlich. Soll diese doch ausgeführt werden, so wird auf den Boden eines Bechers bzw. Wasserglases, das sich über die Schnauze des Tieres stülpen läßt, etwas Watte gelegt und diese mit dem Narkotikum getränkt.

Für Meerschweinchen und Hunde wird am besten Aether, für Katzen, wilde Ratten und andere unbändige Tiere Chloroform benutzt. Morphiuminjektionen können die Narkose unterstützen.

D. Die verschiedenen Infektionsmodi.

1. Infektion vom Intestinaltractus aus.

Man kann die einzubringenden Bakterien mit dem Futter oder mit dem Getränk der Tiere (Wasser oder Milch) mischen. Eventuell müssen die Tiere durch Hungern zur Aufnahme des infizierten Futters genötigt werden. Koch, Gaffky & Löffler[32] brachten die Bakterien in ausgehöhlte Kartoffelwürfel, die wieder mit Kartoffelmasse be-

deckt, auf den hinteren Teil der Zunge gelegt und dann von den Tieren ungeteilt verschluckt wurden. Bei Vögeln bringt man die infizierte Nahrung in den Schnabel und hält diesen zu, worauf die Tiere ohne weiteres das Material verschlucken. Flüssigkeiten verarbeitet man auch mit Mehl zu einem Brei und führt sie auf dieselbe Weise ein. Ehrlich vermengt das zu verimpfende Material mit Kakesmasse, wobei eine sehr genaue Dosierung möglich ist.

Um die keimtötende Wirkung des sauren Magensaftes zu paralysieren, hat R. Koch[33] Meerschweinchen mit der Schlundsonde 5 ccm Natriumkarbonat in den Magen gespritzt und nach einiger Zeit gleichfalls mittels der Sonde eine Aufschwemmung der Keime in Bouillon gegeben. Eventuell gab er noch zur Sistierung der Peristaltik Opiumtinktur 1 ccm auf 200 g Gewicht in die Bauchhöhle. Heim (Lehrb.) verwendet statt Natriumkarbonat eine Schüttelmixtur von Magnesia usta, die nicht wie das Natriumkarbonat gleichzeitig einen Katarrh der Schleimhaut bewirkt.

Die Einführung der Sonde geschieht in der Weise, daß man dem Tier einen durchbohrten, keilförmigen Klotz ins Maul steckt, durch dessen Bohrung die Sonde eingeführt wird. Marks[40a] hat eine besondere Sonde zur Fütterung von Mäusen angegeben.

Nicati & Rietsch[50] umgingen die störende Wirkung des Magensaftes dadurch, daß sie das Material direkt in das durch Laparotomie freigelegte Duodenum einspritzten. Das kann man auch durch Einbringen der zu verfütternden Masse in Glutoidkapseln erreichen.

2. Infektion durch die Lungen.

Um Untersuchungen über die Aufnahme von Keimen durch die Lungen anzustellen, kann man das Versuchstier in einen gut verschlossenen Kasten bringen, in dem eine Suspension der Bakterien in sterilem Wasser versprayt wird. Die Art und Weise, wie hier die Bakterien in Massen in die Luft gelangen, entspricht freilich nicht den natürlichen Bedingungen. Zudem handelt es sich nicht um reine Inhalation, da ein Verschlucken des reichlich herumgespritzten Materials nicht auszuschließen ist. Buchner[7] brachte daher den Sprayapparat außerhalb des Käfigs an und leitete nur die versprayten Dämpfe in diesen hinein. Der Sprayapparat (Fig. 127) befindet sich auf dem Boden eines großen Reagenzglases, das durch einen doppelt durchbohrten Gummipfropfen verschlossen ist. Durch die eine Oeffnung des Gummipfropfens geht ein dünnes, oberhalb des Pfropfens rechtwinklig gebogenes Glasrohr, das mit einem Gebläse verbunden ist, bis zum Sprayapparat, den die bakterienhaltige Flüssigkeit umgibt. Ein zweites weiteres Rohr reicht nur bis zur Unterfläche des Gummipfropfens und steht mit dem Käfig in Ver-

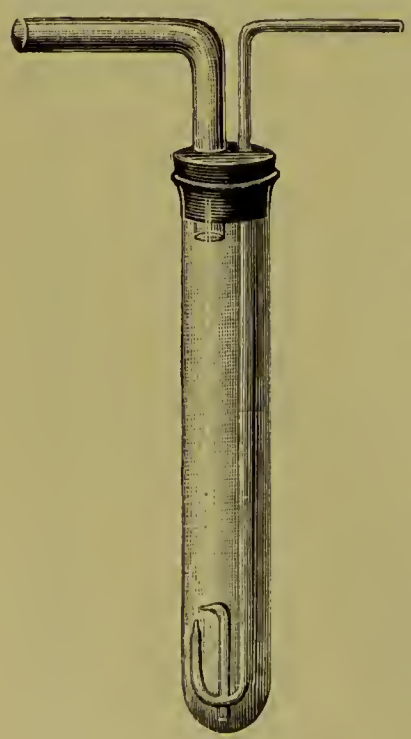


Fig. 127.

bindung. Durch dieses weitere Rohr tritt die mit Bakterien beladene feuchte Luft zu dem Tier. Soll bakterienhaltiger Staub vom Tier eingeatmet werden, so bedient man sich gleichfalls zweckmäßig einer Versuchsanordnung von Buchner. Das Tier befindet sich in einem weitmaschigen Drahtkäfig, welcher von einer Glasglocke überdeckt ist. Diese geht nach unten in einen geschlossenen, trichterförmigen Blechkasten über. Auf den Grund dieses Blechkastens kommt der bakterienhaltige Staub. Durch ein in der oberen Oeffnung der Glocke befindliches und mit einem Gebläse in Verbindung stehendes Rohr kann der Staub aufgewirbelt und der Luft des Käfigs mitgeteilt werden.

Speziell für die Inhalationsversuche mit Pest hat Martini[40] einen Inhalationsapparat (Fig. 128) angegeben, der den Experimentator beim Arbeiten nach Möglichkeit vor Gefahr schützt. Ein von der Firma

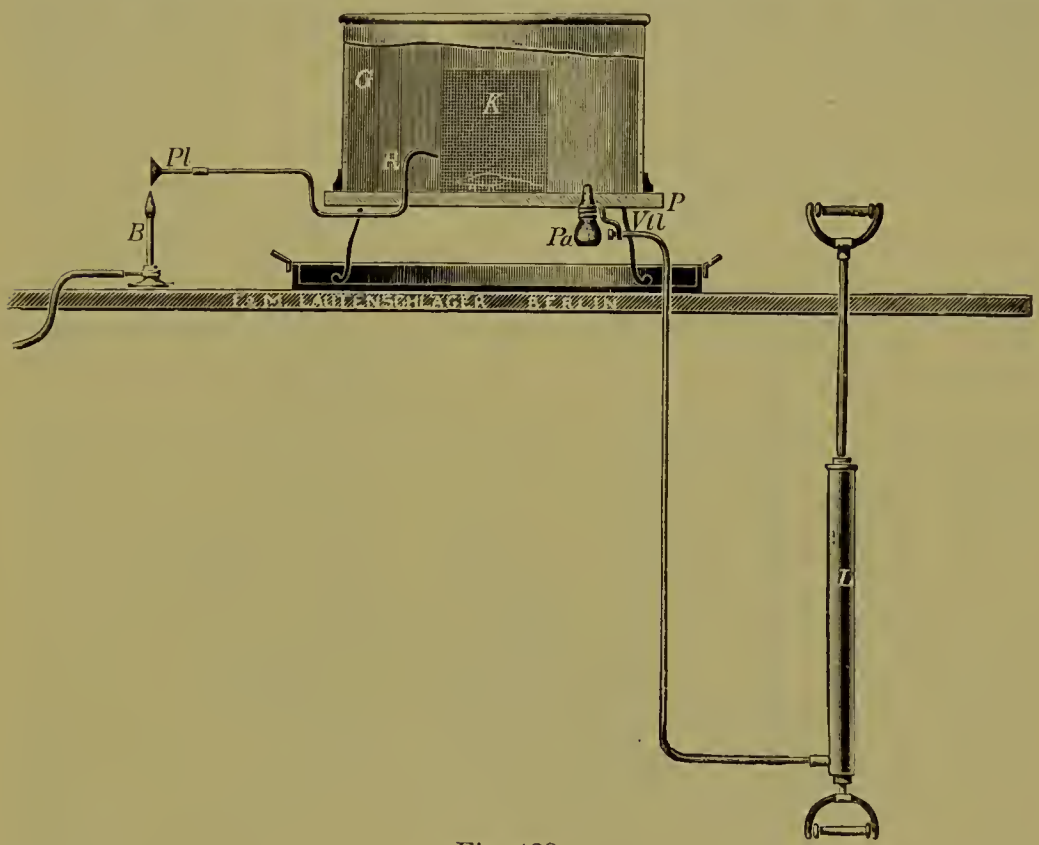


Fig. 128.

Burrough, Wellcome & Co. unter dem Namen „Paroleine" eingeführter Zerstäuber *Pa*, der mit einer Luftpumpe *L* (Fahrradpumpe) in Verbindung steht, ist am oberen Ansatz mittels eines Schraubengewindes in eine Glasplatte *P* luftdicht eingeschraubt. Auf der Glasplatte steht der Käfig *K* mit dem zu infizierenden Tier; darüber wölbt sich eine Glasglocke *G*, die man luftdicht mittels Vaseline auf die Platte aufsetzt. In die Glasplatte ist weiterhin ein nach außen mündendes Rohr *R* eingelassen, das den Luftaustausch zwischen dem Inneren der Glasglocke und der Außenluft vermittelt. An den nach außen mündenden Teil dieses Rohres ist ein Platinrohr *Pl* angeschraubt, das durch einen Brenner *B* erhitzt wird. Die hier mit der infizierten Luft austretenden Keime werden dadurch sofort sicher vernichtet.

Zur Bestimmung der wirklich inhalierten Bacillenmenge und zur Bestimmung der krankmachenden oder tödlichen Minimaldosen wurde von Findel & Reichenbach[11] ein Apparat konstruiert: Die Versuchstiere entnehmen ihre Atemluft einem langsam mit konstanter Geschwindigkeit aufsteigenden Luftstrom, dessen konstanter Bakteriengehalt gleichzeitig gemessen werden kann (Fig. 129).

Ein 15 cm im Quadrat und 30 cm in der Höhe messender Turm (*1*) ist an seinem oberen Ende durch einen 3-fach durchbohrten Gummistopfen abgeschlossen. Von hier führt ein Rohr (*g*) zur Wasserstrahlluftpumpe, ein zweites (*h*) zu einem Manometer (*c*) und ein drittes (*f*) zu einem großen Aspirator (*6*), mit dem bestimmte Mengen Luft abgesaugt werden können. — Aus einem Buchnerschen Sprayapparat wird mit einer Fahrradpumpe unter Zwischenschaltung einer als Windkessel dienenden etwa 3 Liter fassenden Flasche bakterienhaltiger Nebel in den Turm geblasen. Der Spray mündet über dem Boden, die bakterienhaltige Luft steigt empor und wird oben durch die Luftpumpe (*5*) abgeführt.

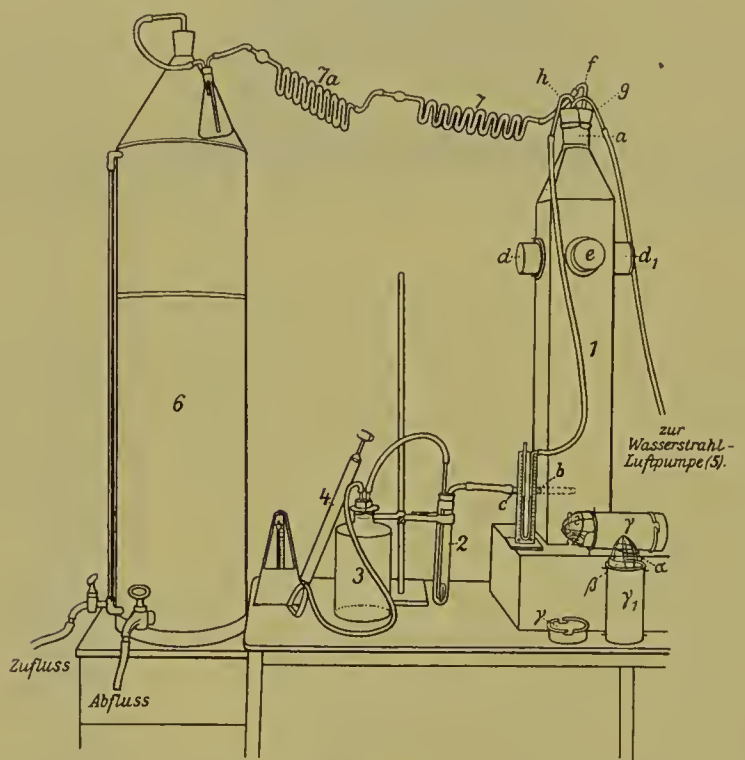


Fig. 129.

Die Meerschweinchen werden in einen Zylinder (γ, γ_1) gesteckt, diese lassen sich in die im oberen Drittel des Turmes befindlichen Oeffnungen (d, d_1) einführen, so daß das Tier mit dem Kopf in den Turm hineinragt. — Die Luftpumpe wird so eingestellt, daß im Turm ständig ein Unterdruck von ca. 20 cm Wassersäule besteht. Hierdurch bleibt die in der Zeiteinheit durch den Spray zugeführte Luftmenge und damit auch der Bakteriengehalt in der Volumeneinheit derselben konstant.

Ein weiterer Inhalationsapparat wurde von Bartel[2] konstruiert.

Da bei Inhalationsversuchen immerhin die Möglichkeit gegeben ist, daß die Infektion durch Mund und Nasenhöhle erfolgt, so em-

pfiehlt es sich unter Umständen, die Einspritzung direkt in die Trachea vorzunehmen. Man legt die Trachea frei und injiziert unter Vermeidung von Schleimhautverletzungen das Material mit einer Spritze, deren Kanüle zwischen zwei Trachealringen eingestochen wird. Natürlich ist eine Infektion der Operationswunde streng zu vermeiden.

3. Impfung von der Haut aus.

Von der **unverletzten Haut** aus hat zuerst Garré[17] durch Einreibung der Bakterien Infektionen erzielt.

Kutane Impfungen werden in der Weise vorgenommen, daß man das Material in leichte Hautverletzungen, wie sie z. B. schon beim Rasieren der Haut gesetzt werden, hineinbringt. Zweckmäßig nimmt man die Impfung am Ohr vor, das die Tiere nicht belecken können.

Sehr schön läßt sich die Entwickelung der Infektion beobachten, wenn man in die durchsichtige Hornhaut impft.

Soll bei der **subkutanen Impfung** das Material absolut ohne Vermengung mit an der Haut haftenden Keimen eingebracht werden, so ist strenge Asepsis beim Operieren nötig.

Die subkutane Impfung erfordert eine verschiedene Methode, je nachdem es sich um die Einbringung festen oder flüssigen Materials handelt. Bei Einimpfung festen Materials (Gewebsstücke usw.) legt man mit einem Scherenschnitt eine kleine Hautwunde an, erweitert dieselbe mittels eines Platinspatels zu einer Tasche und schiebt das Material mit einer Platinnadel oder einer Pinzette ein. Die Wunde kann mit Kollodium verschlossen oder eventuell vernäht werden. Die Injektion von Flüssigkeiten erfolgt in eine Hautfalte. Durch Massage wird nachher das Material im Unterhautzellgewebe gleichmäßig verteilt. Ebenso wie subkutan erfolgt die Impfung intramuskulär.

Beim Kaninchen und Meerschweinchen wählt man Bauch oder Rücken, bei Mäusen die Schwanzwurzel als Injektionsstelle.

Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Urin vermischt Bloch[4, 5] stark eitrige Sedimente mit 4-proz. Antiforminlösung, neutralisiert das Antiforminlösungsediment mit 5-proz. Natriumsulfit und 5-proz. Schwefelsäure und injiziert es in die rechte Seitengegend des Meerschweinchens. Dann faßt er die rechte Seitenfalte des Tieres zwischen Daumen und Zeigefinger und knetet einige Mal reibend die Leistengegend, immer mit den beiden Fingern von der Tiefe zur Oberfläche gehend. Dabei kommen die Leistendrüsen als ganz kleine Knötchen zwischen den reibenden Fingern zur Wahrnehmung und werden durch festeres Zudrücken gequetscht. War der Urin tuberkelbacillenhaltig, so sind die gequetschten Drüsen schon nach 9—10 Tagen haselnußgroß. Die Drüsen werden exstirpiert, klein geschnitten und in 20-proz. Antiforminlösung zerrieben, bis eine homogene, milchige Flüssigkeit entsteht; diese wird zentrifugiert, das Sediment ausgestrichen und auf Tuberkelbacillen gefärbt.

Zur Uebertragung bzw. Weiterzüchtung der Spirochaeta pallida hat sich die Hodenimpfung am geeignetsten erwiesen: Bei Kaninchenböcken wird der Hoden vorgedrückt, ein Hautschnitt gemacht, mit stumpfem Instrument eine Hauttasche angelegt und Stückchen syphilitischer Kaninchengewebe oder menschlichen Primäraffekts eingeschoben.

4. Impfung in die Brusthöhle.

Man geht mit der Kanüle in einen Interkostalraum ein und injiziert. Um Verletzungen zu vermeiden, empfiehlt sich die Verwendung einer stumpfen Kanüle (wobei vorher die Haut zu durchtrennen ist, s. unten).

5. Impfung in die Bauchhöhle.

Bei der intraperitonealen Impfung besteht die Gefahr einer Darmverletzung und damit einer Mischinfektion. Das wird vermieden, wenn man nach dem Vorgang von R. Pfeiffer stumpfe Kanülen verwendet. Zu dem Zweck ist es nötig, die Bauchdecke in der Mitte zwischen Sternum und Symphyse mit einem kleinen Scherenschnitt einzuschneiden. Durch die freiliegende Muskulatur dringt die Kanüle ohne Mühe durch. Von Stevenson & Bruce[64] ist eine besondere Kanüle zur Injektion in die Bauchhöhle angegeben worden. Sie besteht aus einer gekrümmten Nadel, deren Ausflußöffnung sich nicht am Ende, sondern an der Konvexität befindet. Bei der Injektion hebt man eine Bauchfalte samt dem Peritoneum auf, stößt die Nadel durch, läßt die Bauchfalte los und vollzieht die Injektion. Sobernheim steckte in gleicher Weise eine gewöhnliche Kanüle durch eine Bauchhautfalte und zog sie dann etwas zurück, bis sie frei in das Peritoneum hineinragte. Friedberger[14] nimmt die intraperitoneale Injektion am Meerschweinchen in der folgenden Weise vor: Das Meerschweinchen wird mit dem Kopf nach unten, Bauchseite nach links, vertikal, bis über den Thorax in die linke Brusttasche des Laboratoriumsmantels gesteckt. Durch darauffolgende Horizontalstellung des Tieres unter leichter Drehung nach rechts werden Kopf und Vorderbeine in der sich bildenden Taschenfalte gut fixiert; die Hinterbeine werden in der Beckengegend zwischen Mittel- und Ringfinger der linken Hand gefaßt und Daumen und Zeigefinger bewerkstelligen die Fixation der mit der rechten Hand eingeführten Spritze in der Injektionsstelle. Es empfiehlt sich hierbei die Verwendung der oben beschriebenen Spritze für intraperitoneale Injektion.

6. Impfung in das Zentralnervensystem.

Zur Injektion in die Gehirnmasse bzw. unter die Hirnhaut (z. B. zur Fortzüchtung des Wutvirus) muß der Kopf des Tieres trepaniert werden. Es geschieht dies zweckmäßig mit einem von Kollin angegebenen und von Babes[1] für diese Zwecke modifizierten Trepan:

Nach Reinigen der Kopfhaut mit Alkohol werden durch einen von der Mittellinie etwa 2 mm entfernten Schnitt von $1^1/_2$ cm Länge die Weichteile durchtrennt. Dann wird das Periost zur Seite geschoben und der Trepan auf einer Linie, die die beiden Augenwinkel verbindet, aufgesetzt und vorsichtig eingebohrt. Ist die Durchbohrung beendet, so wird das Knochenstückchen, falls es nicht im Bohrer haftet, mit einem scharfen Häkchen entfernt. Mit einer Kanüle, der man durch Biegen eine winklige Form von 60^0 geben kann, sticht man unter die Hirnhaut ein, geht etwa 1 cm nach vorn, und spritzt eine Spur Flüssigkeit ein. Nach Spaltung der Dura läßt sich eine Impfung auch mit Platindraht vornehmen. Die Wunde wird durch Naht oder Michelklammer geschlossen und mit Kollodium bedeckt.

Injektionen in den Wirbelkanal werden nach Heubner[22] in der Weise vorgenommen, daß man mit der Kanüle zwischen zwei Wirbeln eingeht und in die Dura einimpft.

7. Impfung in das Auge.

Impfung der Cornea geschieht durch Stichelung und darauffolgendes Einreiben des infektiösen Materials (Uebertragung der Syphilis). Auch die Bildung einer Tasche und das Einschieben infektiöser Gewebsstückchen kann unter Umständen angebracht sein, ebenso die Impfung in die Corneallamelle mit sehr feiner Kanüle.

Die Impfung in die vordere Augenkammer gestattet ebenso wie die in die Cornea die Beobachtung des sich entwickelnden Krankheitsprozesses. Man hält beim narkotisierten Tier (eventuell kokaïnisieren) den Augapfel mit einer Pinzette nach unten und geht am oberen äußeren Rand der Cornea mit einer Lanzette ein. Während des Zurückziehens derselben muß die Spitze gegen die Hornhaut gerichtet sein, damit die eventuell prolabierende Iris nicht verletzt wird. In die gesetzte Oeffnung wird das zu impfende Material mit einer Irispinzette oder einer Spritze eingebracht. Auch durch Einstich in die vordere Kammer mit der Kanüle einer Pravazspritze nahe dem Limbus unter Vermeidung einer Irisverletzung und nachfolgender Injektion des Impfmaterials (für Syphilis zerriebenes und in NaCl-Lösung aufgeschwemmtes syphilitisches Gewebe) kann die Impfung ausgeführt werden.

Die Impfung des Glaskörpers erfolgt nach Einstich mit der Kanüle durch die Sklera in den Glaskörper und Injektion des infektiösen Materials.

8. Impfung in die Blutbahn.

Bei Kaninchen erfolgt die Injektion in die komprimierte, vorher durch einen Scherenschnitt oberflächlich freigelegte äußere Randvene des Ohres. Bei kleineren Tieren legt man die Jugularis frei und impft in diese. Verschluß der Hautwunde kann durch Michelklammer erfolgen.

Bei größeren Tieren (aber auch bei Meerschweinchen und Kaninchen) kann man durch Druck am Halse die Vena jugularis zum Anschwellen bringen und direkt die Kanüle einführen. Man schneidet an der betreffenden Stelle die Haare ab, kauterisiert eine kleine Hautstelle und geht durch den sterilen Schorf mit der Kanüle ein.

Bei Meerschweinchen und Ratten kann man auch nach Morgenroth[43] intracardial injizieren:

Nachdem die Haare links am Sternum abgeschoren sind, wird das Tier senkrecht gehalten und möglichst immobilisiert. Wenig links vom Brustbein und etwa 1 Finger breit oberhalb des Proc. xiphoideus wird die Stelle des stärksten Herzstoßes ermittelt, die Nadel vorsichtig eingestochen und unter leichten Drehungen langsam weiterbewegt. Je nach der Herzabteilung, in die man geraten ist, dringt mehr oder weniger Blut heraus (Verfahren daher auch zur Blutentnahme geeignet). Zur Injektion setzt man rasch die Spritze auf, injiziert langsam höchstens 2 ccm und zieht hierauf die Nadel mit raschem Ruck zurück.

Bei Mäusen injiziert man nach vorheriger Stauung und Einreibung mit Xylol mittels sehr feiner Kanüle langsam in eine der Schwanzvenen, beim Frosch in die Bauchvene nach Einschneiden der Haut.

9. Blutentnahme am Tier.

Blutentnahme ohne besondere aseptische Kautelen geschieht beim Kaninchen aus der äußeren Randvene des Ohres. Um Hyperämie zu erzeugen, hält man das Tier, wie oben angegeben, das Hinterteil in der Achselhöhle fixierend und mit dem linken Arm schienend mit dem Kopf nach unten. Aufträufeln von Aether, besonders aber von Xylol, bewirkt stärkere Hyperämie, doch hat Xylol wieder den Nachteil, daß die Gefäßdilatation erst allmählich zurückgeht, wodurch Nachblutungen entstehen können. Beim Schnitt darf die Randvene des Ohres nicht durchgeschnitten werden, weil sich dann die Enden retrahieren und die Blutung bald nachläßt. Es wird nur ein Stückchen aus der oberen Gefäßwand mit der Cowperschen Schere herausgeschnitten.

Prym[56] empfiehlt Kaninchen, denen man reichlich Blut entnehmen will, in einen den Bierschen Heizkästen ähnlichen Kasten zu stecken. Den Kopf läßt man aus einer Oeffnung heraussehen. Dann heizt man den Kasten bis zu Temperaturen von 40—70°. Die Ohrvenen schwellen an und man kann leicht punktieren.

Bei kleinen Tieren (Meerschweinchen, Ratten usw.) erfolgt die Blutentnahme aus der freigelegten Carotis oder Jugularis. Bei Mäusen kann man kleinere Blutmengen durch Abschneiden eines kleinen Stückes Schwanzendes erhalten. Bei den Vögeln geschieht die Blutentnahme aus der Flügelvene.

Bei größeren Tieren wird zur Blutentnahme eine Kanüle in die gestaute Halsvene eingeführt und nach der Entnahme einfach herausgezogen; Verband unnötig.

Die völlige Entblutung erfolgt am besten aus der Carotis oder dem freigelegten Herzen.

Zur sterilen Entnahme bei Tieren führt Salomonsen eine am einen Ende fein ausgezogene und verschlossene Glasröhre in die Blutbahn ein, bricht hier die Spitze ab und saugt durch den weiteren und mit Watte verstopften Teil des Rohres das Blut ein. Die feine Oeffnung wird unmittelbar nach der Entnahme wieder abgeschmolzen.

Eine keimfreie Entnahme ist gleichfalls mit der folgenden Methode gewährleistet. Man zieht die Kuppe eines sterilen, mit Watte verschlossenen Reagenzglases über der Flamme zu einer Kapillare aus, bricht an der dünnen Stelle ab und geht mit dem scharfen Ende in die freigelegte Arterie ein. Durch den Blutdruck steigt das Blut in dem Reagenzglas in die Höhe. Nach Herausnahme des Röhrchens und Unterbindung des Gefäßes wird die feine Mündung des Reagenzglases über der Flamme vorsichtig zugeschmolzen.

van Loghem[37] zieht das durchschnittene zentrale Ende des Gefäßes, das durch eine Klemme verschlossen ist, mit einem kleinen an einem Faden befestigten Häkchen in eine weitere Glaskanüle hinein, hierauf wird die Klemme geöffnet.

Bronstein[6] hat einen Apparat zur Blutgewinnung bei großen Tieren angegeben. Er besteht aus einem über 1 l fassenden zylindrischen Gefäß, das am unteren Ende einen Ansatz mit Oeffnung hat.

Hier wird ein Kautschukschlauch mit Kanüle angebracht. Die Kanüle wird in die Vene eingeführt.

Dschunkowsky[10] hat einen Apparat zur Entnahme und gleichzeitigen sterilen Defibrinierung des Blutes angegeben (Fig. 130). Er besteht aus einem Gefäß von mehreren Litern Inhalt, an dessen oberem Rande und am Boden sich je eine Oeffnung befindet. An der oberen wird ein Schlauch mit Kanüle, an der unteren ein Schlauch mit Glasrohr befestigt. Kanüle und Glasrohr sind von Reagenzgläsern umgeben. Der Deckel des Gefäßes besteht aus einer großen Gummikappe, die im Zentrum nach oben stielförmig ausgezogen ist. In dem „Stiel" ist ein Glasrohr mit Gummiansatz (zum Schlagen des Blutes) senkrecht befestigt. Der Apparat kann in toto sterilisiert werden. — Das Blut tritt an der oberen Oeffnung ein, kann steril geschlagen werden und verläßt das Gefäß an der unteren Oeffnung. (Weitere Methoden der Blutentnahme vgl. Kap. IV.)

Fig. 130.

E. Die Methode der Tiersektion.

Das Tier wird auf dem Rücken liegend auf ein Brett aus Holz oder besser Metall (sterilisierbar) aufgespannt, indem die vier Extremitäten mit Nägeln bzw. Klemmen auf der Unterlage befestigt werden. Die Haare werden in der Mitte der Bauch- und Brusthaut abgeschoren, die Haut eventuell rasiert und die Hautfläche mit Sublimat benetzt. Die Haut wird nunmehr vom Manubrium sterni bis zur Symphyse durchtrennt. Ferner werden an den Enden des Längsschnittes Querschnitte nach den Extremitäten zu angelegt und die Haut wird vollständig zurückpräpariert, wobei man auf eventuelle Veränderungen im Gewebe zu achten hat. Sind Drüsenschwellungen, Abszesse oder entzündliche Erscheinungen des subkutanen Gewebes vorhanden, so werden zunächst Drüsenteile oder Stücke der veränderten Haut mit sterilen Instrumenten herausgeschnitten und in sterile Doppelschälchen gebracht. Eiter aus Abszessen wird sofort auf Nährböden ausgestrichen und eine andere Partie zu mikroskopischen Präparaten verarbeitet. Nach der Untersuchung der Haut werden die freiliegenden Bauchdecken nochmals mit Sublimat abgespült, um eventuell aufliegende Haare zu beseitigen. Man faßt nunmehr mit einer sterilen Pinzette die Bauchwand und trennt sie in der Linea alba mit einer mit stumpfer Spitze versehenen Schere durch. Es erfolgt zunächst eventuell eine Aussaat des Peritonealexsudats und die Anlegung mikroskopischer Präparate aus demselben.

Alsdann werden die Organe der Bauchhöhle oder geeignete Stücke davon nacheinander mit sterilen Instrumenten herausgenommen und in sterile Doppelschalen eingelegt. Soll der Darmtractus untersucht werden, so wird er nach Beendigung der Thoraxsektion oberhalb des Magens und am Rectum unterbunden, vom Mesenterium getrennt und gleichfalls in eine sterile Schale gebracht.

Die Eröffnung des Thorax erfolgt durch zwei Schnitte zu beiden Seiten des Sternums. Das Herz wird mit einem heißen Platindraht oder mit sterilem Messer angestochen und ein Heraustreten der Blutstropfen zur Aussaat, eventuell zur mikroskopischen Untersuchung benutzt. Nunmehr erfolgt die Herausnahme der Lungen und des Herzens und die Aufbewahrung in steriler Schale.

Zur Freilegung des Rückens, an dem sich eine eventuell zu untersuchende Impfstelle befinden kann, wird die Halswirbelsäule durchtrennt und die Haut von oben nach unten freipräpariert.

Es ist darauf zu achten, daß man möglichst für die Entnahme jeden Organs, vor allem aber für die äußeren Hautschnitte besondere sterile Instrumente benutzt. Die gebrauchten Instrumente werden sogleich in einen in Tätigkeit befindlichen Schimmelbuschschen Sterilisierungsapparat oder in Karbolwasser gebracht.

Nach Beendigung der Sektion werden die einzelnen Organe mit sterilen Instrumenten aufgeschnitten, dann mit sterilen Pinzetten gefaßt, auseinandergerissen und möglichst aus der Tiefe das Material zur Züchtung mit sterilem Platindraht herausgenommen. An die Aussaat schließt sich die Verfertigung mikroskopischer Präparate an; danach werden Stücke der Organe zur Fixierung in Alkohol gebracht.

Conradi[8a] hat speziell für Schlachttiere eine Methode ausgearbeitet (das Verfahren ist natürlich auch für den Tierversuch anwendbar), um einerseits Zutritt von Luftkeimen und Verstöße gegen die Asepsis zu vermeiden, andererseits in Organen spärlich vorhandene Keime anzureichern. Für Schlachttiere gestaltet sie sich wie folgt: Organstücke, ca. 50 g schwer, werden unmittelbar nach der Schlachtung entnommen. Einlegen in Öel von 200°. Dann 4 Stunden in 2-proz. Sublimat; Einbringen in steriles Spitzglas, dessen Deckel durch Kolophonium und Wachs luftdicht abgeschlossen wird. Bebrüten bei 37° 2 Stunden lang. Danach halbieren und Aussaat aus den zentralen Partien auf Nährböden. (Auch die bei der Entnahme zu verwendenden Instrumente werden in Oelbad sterilisiert.)

Der Kadaver wird nach Beendigung der Obduktion verbrannt.

Zur Vernichtung der Kadaver infizierter Tiere kommt allein die Verbrennung in Frage. Dies geschieht im Winter am einfachsten in der zentralen Verbrennungsanlage; falls diese nicht vorhanden und im Sommer sind besonders konstruierte Verbrennungsöfen zu empfehlen.

Der Verbrennungsofen von M. Neisser (Fig. 131) besitzt indirekte Luftzuführung, eine Gasfeuerung, die das Objekt von allen Seiten bestreift und einen Fettfang, der ein Heruntertropfen von infektiösem Material verhütet. Der Einwurf ist so konstruiert, daß kleinere Versuchstiere, wie Kaninchen und Meerschweinchen, ohne Berührung direkt vom Sektionsbrett in den Ofen gebracht werden können. Normal dauert die Verbrennung eines Kaninchens in dem

Ofen inkl. Anheizen ca. 2 Stunden, bei Anwendung einer Gebläsevorrichtung ca. 1 Stunde. Ist der Ofen angeheizt, so verbrennt die zweite Beschickung bedeutend schneller.

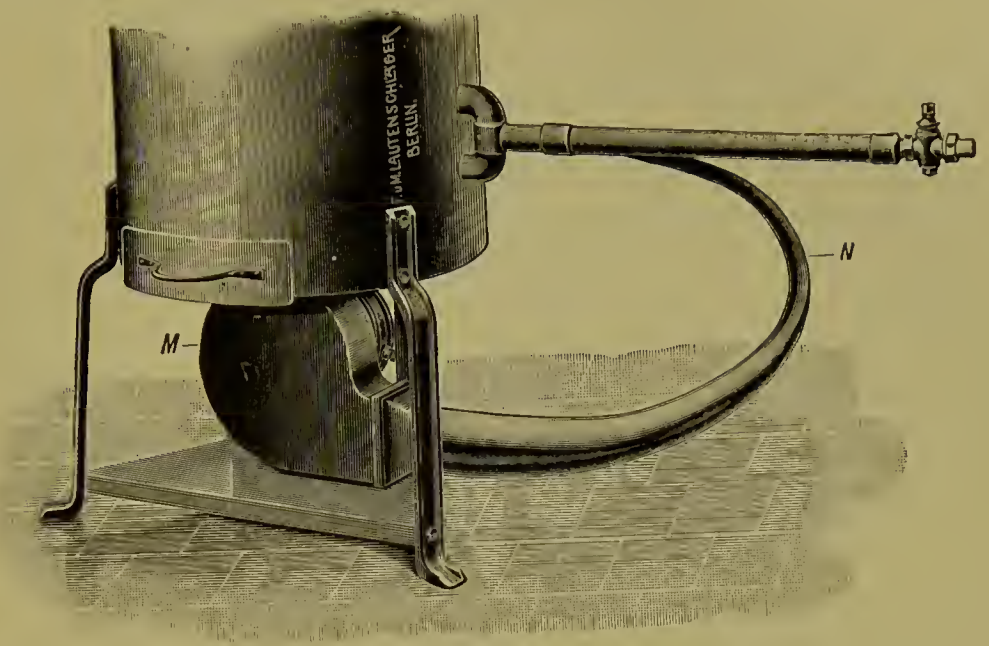


Fig. 131.

Literatur zum V. Kapitel.

1. Babes, Annales de l'Institut Pasteur, No. 7, 1888.
2. Bartel, J., Wien. klin. Wochenschr., 1905, Nr. 7.
3. Bertarelli, Centralbl. f. Bakt., Bd. 41 u. 43, 1906.
4. Bloch, A., Berl. klin. Wochenschr., 1907, Nr. 17.
5. — Aerztl. Verein, Frankfurt a./M., 8. Okt. 1910.
6. Bronstein, Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, Heft 4, 1906.
7. Buchner, ebd., I. Abt., Bd. 6, 1889.
8. Claussen, 34. Zusammenkunft d. ophthalmol. Gesellsch. Heidelberg, Aug. 1907.

8a. Conradi, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Ref., 1909; Verhandl. d. III. Tagung d. Vereinig. f. Mikrobiol.

9. Cowl, Du Bois-Reymond Arch., 1896.
10. Dschunkowsky, Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, Heft 1, 1904.
11. Findel, H., Zeitschr. f. Hyg., Bd. 57, 1907.
12. Finger & Landsteiner, Sitz.-Ber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. in Wien, Mathem.-naturw. Klasse, Bd. 114, Abt. III, 1905.
13. Fligg, Inaug.-Diss., Gießen 1908.
14. Friedberger, E., Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, Heft 6, 1905.
15. Frost, W. D., ebd., Bd. 34, Nr. 7, 1903.
16. Fürth, E., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 57, Heft 2, 1907.
17. Garré, Fortschr. d. Med., 1885.
18. Gins, Centralbl. f. Bakt., Bd. 59, Heft 4, 1911.
19. Grünbaum & Smedler, Brit. med. Journ., März 1906.
20. Halberstädter, L., Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd.
21. Harris, N. M. L., Centralbl. f. Bakt., Bd. 32, Nr. 1, 1902.
22. Heubner, Deutsche med. Wochenschr., 1896.
23. Heymann, B., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 62, Heft 3, 1909.
24. Hoffmann, Verein f. inn. Med. Berlin, 18. Dez. 1905.
25. — Freie Verein. f. Mikrobiol., Juni 1906.
26. Hoffmann, E., Verein f. inn. Med. Berlin, 17. Juni 1907.
27. Hoffmann, E. & Brüning, Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 14.
28. Hoffmann, ebd., 1910, Nr. 22.
29. Inghilleri, F., Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 31, Nr. 4, 1902.

30. Kern, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 38, Heft 1, 1905.
31. Klebs, Deutsche med. Wochenschr., 1892.
32. Koch, Gaffky, Löffler, Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 2, 1884.
33. Koch, Berl. klin. Wochenschr., 1885.
34. Levaditi & Yamanouchi, Soc. méd. des hôpit., 30. Mai 1908.
35. Liebermeister, 80. Versamml. deutscher Naturf. u. Aerzte, 1908.
36. v. Lingelsheim, Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 31.
37. van Loghem, Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, H. 1, 1908.
38. Lüdke, Wien. klin. Wochenschr., 1906, Nr. 31.
39. Macewen, A., Brit. med. Journ., 25. Januar 1908.
40. Martini, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 38, 1901.
40a. Marks, Arb. a. d. Kgl. Inst. f. exper. Therapie, Frankfurt a. M., Heft 4, 1908.
41. Metschnikoff & Roux, Annal. Past., Nov. 1905.
42. Metschnikoff, Acad. de méd., 15. Mai 1906.
43. Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr., 1904, Nr. 20.
44. Mühlens, Deutsche med. Wochenschr., 1907, Nr. 30.
45. Müller, Curt, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 13, 1893.
46. Mulzer, Berl. med. Gesellsch., 8. Dez. 1909. Ref. Berl. klin. Wochenschr.
47. Neisser, Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 3.
48. — ebd., 1906, Nr. 13.
49. Neisser & Grouven, Dermatol. Zeitschr., 1908, Heft 2.
50. Nicati & Rietsch, Semaine méd., 1884.
51. Parodi, Umberto, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 5, 1907.
52. Petruschki, Zieglers Beitr., Bd. 33, 1888.
53. — Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 12, 1892.
54. Pfeiffer, R., ebd., Bd. 17, 1894.
55. — ebd., Bd. 11, 1892.
56. Prym, Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 14.
57. Rabinowitsch, Deutsche med. Wochenschr., 1909, Nr. 25.
58. Schucht, Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 3.
59. Schultze, Walter, ebd., 1906, Nr. 38.
60. Siegel, J., Centralbl. f. Bakt., Bd. 48, Heft 5, 1909.
61. Silberschmidt, 3. Tagung d. fr. Verein. f. Mikrobiol., Juni 1909.
62. Sobernheim, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 15, 1893.
63. — ebd., Bd. 20, 1895.
64. Stevenson & Bruce, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 9, 1891.
65. Tomasczewski, Deutsche med. Wochenschr., 1910, Nr. 22.
66. Truffi, M., Centralbl. f. Bakt., Bd. 48, Heft 5, 1909.
67. — ebd., Bd. 52, Heft 5, 1907.
68. — Berl. klin. Wochenschr., 1910, Nr. 34.
69. Uhlenhuth & Mulzer, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 33, Heft 1, 1909.
70. — — Freie Vereinig. f. Mikrobiol., Mai 1910.
71. — — Berl. klin. Wochenschr., 1910, Nr. 25.
72. Voges, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 18. 1895.
73. Weber, A., Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 7.
74. Woithe, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 7, 1909.
75. Joannovics & Kapsammer, Berl. klin. Wochenschr., 1907, Nr. 45.
76. Zabolotny, 9. Kongr. d. Deutschen Ges. in Bern, Sept. 1906.

VI. Kapitel.

Methoden der Beobachtung der Lebensäusserungen der Bakterien.

A. Methoden der Beobachtung der Lokomotionsfähigkeit.

Das Studium der Bewegung der Bakterien geschieht im hängenden Tropfen, wo man sowohl Ortsveränderung als auch Bewegungen an Ort und Stelle, wie Drehung der Bakterien um ihre Körperachse, Wirbelbewegung usw. studieren kann.

Die Bewegungsorgane selbst, die Geißeln, kann man deutlich entweder im Dunkelfeld oder im gefärbten Präparat zur Darstellung bringen (siehe oben). Bei der mikroskopischen Betrachtung ist darauf zu achten, daß nicht die tatsächliche Schnelligkeit der Bewegung, sondern eine entsprechend vergrößerte beobachtet wird.

Die Bewegungsintensität ist von verschiedenen äußeren Momenten abhängig. Die Bewegungsfähigkeit kann bei unter normalen Verhältnissen beweglichen Arten ganz verloren gehen. Hemmenden Einfluß haben ungenügende Ernährung, ungünstige Reaktion und Zusammensetzung des Nährbodens, ferner ungünstige Temperaturen und bei aëroben Arten Sauerstoffmangel. Auf diese Momente hat man Rücksicht zu nehmen, sobald man ein sicheres Urteil über die Bewegungsfähigkeit einer Bakterienart gewinnen will, z. B. läßt sich die von Pfeffer so genannte „Hungerstarre" durch Züchtung auf geeigneten Nährböden wieder aufheben. Der hemmende Einfluß zu starker Salzkonzentration des Nährbodens wird durch Auswaschen der Bakterien mit Wasser wieder aufgehoben. Die Starre infolge Beobachtung bei zu niederer Temperatur wird durch günstigere Temperatur beseitigt und die Bewegungsfähigkeit nimmt dann bis zu einem Optimum an Intensität zu. Durch chemische Einflüsse kann die Bewegung eine gewisse Richtung erhalten (positive und negative Chemotaxis).

Eine vergleichende Messung der aktiven Beweglichkeit der Bakterien sowohl auf festen wie auf flüssigen Nährböden hat Gabritschewski[53] nach einer besonderen Methode versucht. Genau horizontal in Petrischalen erstarrte Agarböden werden mit einem sterilen runden Stück in Bouillon getränkten Fließpapiers bedeckt, auf dem man vorher ein Kreuz mit 4 gleich langen Schenkeln in Quadratzentimetereinteilung liniiert hat. Das Papier wird mit einer dicken Platinöse auf der Agarplatte so ausgebreitet, daß die darunter befindlichen Luftblasen verschwinden. Auf den vier Schenkeln des mit Quadratzentimetereinteilung versehenen Kreuzes werden 1 qcm große Stückchen von sterilisiertem Filtrierpapier verschieden weit von der Mitte entfernt aufgelegt. Die Mitte des zentral gelegenen Quadrats infiziert man mittels einer Platinöse mit der Kultur der zu untersuchenden Bakterienart und bringt die Platte in den Brutschrank. Nach einigen Stunden entnimmt man mittels steriler Pinzetten die verschieden weit von der Mitte aufgelegten Papierstückchen und bringt sie in Bouillonröhrchen. Es wird eine Infektion der Bouillonröhrchen nur durch diejenigen Stückchen erfolgen, bis zu denen die Bakterien über das Filtrierpapier hingewandert waren. Die Zeit, in der die Bakterien so eine gewisse Entfernung zurücklegen, gibt einen Aufschluß über die Schnelligkeit ihrer Bewegung. Die Wachstumsgeschwindigkeit, die gleichfalls hier in Betracht zu ziehen ist, spielt nach Gabritschewski nur eine untergeordnete, das Resultat nicht wesentlich störende Rolle.

Liachowetzky[89] benutzt ein Filter aus schwedischem Papier, das er in eine mit Agar gefüllte Petrischale legt, so daß es vom Kondenswasser durchtränkt wird. Auf dem Filter befindet sich eine Zeichnung von 3 sich in einem Punkt schneidenden, mit Maßstab versehenen Geraden. Im Schnittpunkt findet die Beimpfung des Filters statt. In bestimmten Entfernungen vom Impfpunkt sind sterile Seidenfäden gelegt, die nach bestimmter Zeit in sterile Bouillon über-

tragen werden, um festzustellen, wie weit die Wanderung der Bakterien stattgefunden hat.

Um die Bewegungsgeschwindigkeit in flüssigen Medien zu studieren, nimmt Gabritschewski eine Glasröhre, die an einem Ende nach oben gebogen und vermittels gut schließender Glashähne in vier Abschnitte zerlegt ist. Die Länge eines jeden Abschnittes beträgt etwa 5 cm. Der sterilisierte Apparat wird bei offenstehenden Hähnen mit der Nährflüssigkeit gefüllt. Nachdem der zugehörige Hahn geschlossen ist, wird der nach oben gebogene Endabschnitt der Röhre wieder geleert und es wird hier die sterile Nährflüssigkeit durch eine Bouillonkultur der zu untersuchenden Bakterienart ersetzt. Man öffnet alsdann den Hahn wieder und stellt den Apparat in den Brutschrank. Die Schnelligkeit des Fortschreitens der Trübung in den einzelnen Abschnitten gibt einen Maßstab für die Geschwindigkeit der Bakterienbewegung und die Wachstumsenergie. Man kann auch aus den verschiedenen Abschnitten, ehe schon mikroskopisch eine Trübung sichtbar ist, Proben entnehmen, in Bouillon impfen und danach ersehen, wie weit das Wachstum bereits vorgeschritten ist. Bei dieser Versuchsanordnung kommt als störendes Moment allerdings noch die Brownsche Molekularbewegung und Diffusionsströmungen zwischen den einzelnen Abschnitten des Apparates in Betracht; diese sind eine Folge der Veränderung der chemischen Zusammensetzung des Röhreninhalts, bedingt durch das Bakterienwachstum. Immerhin gibt aber auch dieses Verfahren, wenn auch weniger genau als die Plattenmethode, einen Maßstab für die aktive Beweglichkeit der Bakterien. Beide Methoden sind auch zur Isolierung beweglicher Arten von anderen und zur Isolierung von verschieden intensiv beweglichen Arten zu gebrauchen.

Carnot & Garnier[28] beschreiben eine Methode, um gut bewegliche von nicht oder langsamer beweglichen Bakterien zu trennen, sowie deren Fortbewegungsgeschwindigkeit annähernd zu bestimmen. Sie benützen hierzu eine in der Mitte dünn ausgezogene, U-förmig gebogene Röhre, deren einer weiterer Schenkel mit einer 10—25 cm hohen Schicht bouillondurchtränkten feinen Quarzsandes angefüllt ist, während darüber, ebenso wie im engeren Schenkel, sich Bouillon befindet. Die in den letzteren eingesäten Bakterien müssen die Sandschicht durchdringen, um sich durch Trübung der darüber stehenden Bouillon bemerkbar zu machen. Nur bewegliche Bakterien vermögen von einer bestimmten Höhe der Sandschicht ab letztere zu durchdringen; die Zeit der Passage ist im allgemeinen proportional der Stärke ihrer Beweglichkeit.

Lehmann, Fried[87] und Stiegel[145] beobachteten die Bewegung der Bakterien im hängenden Tropfen mittels des Okularmikrometers.

B. Methoden zur Beobachtung der Vermehrung der Bakterien.

Die Vermehrung der Bakterien kann im hohlgeschliffenen Objektträger, besonders bei Anwendung des heizbaren Objekttisches direkt beobachtet werden. Eine maximale Vermehrungsgeschwindigkeit findet aber unter den hier herrschenden ungünstigen Ernährungsverhältnissen und der ungenügenden Sauerstoffzufuhr nicht statt: eine quantitative Bestimmung ist daher nicht möglich.

Eine Methode, die es gestattet, die Vermehrungsgeschwindigkeit von Bakterien unter günstigen äußeren Bedingungen zahlenmäßig zu bestimmen, ist von Buchner, Longard & Riedlin[22] angegeben. Sie impften eine Fleischwasserpeptonzuckerlösung mit der zu untersuchenden Art und bestimmten die Zahl der Bakterien in der Aussaat (primäre Plattenkulturen); nach einer bestimmten Zeit der Bebrütung wurde dann die Zahl der Bakterien in der Ernte (sekundäre Plattenkulturen) bestimmt. Mit Berücksichtigung der Zeitdauer zwischen Aussaat und Ernte läßt sich aus der Differenz der Kolonienzahl zwischen der primären und sekundären Platte die Größe der Generationsdauer, d. h. die Vermehrungsgeschwindigkeit berechnen. Bezeichnet man mit a die Zahl der Bakterien der primären Platte, mit b die Zahl der Bakterien der sekundären Platte und mit n die Zahl der Generationen, so werden aus a Bakterien unter Voraussetzung, daß die Bakterien sich stets durch Zweiteilung vermehren, nach einer Generation $a.2$, nach zwei Generationen $a.2^2$, nach drei Generationen $a.2^3$ und nach n Generationen $a.2^n$; $b = a.2^n$; $n = \frac{\lg b - \lg a}{\lg 2}$. Die Dauer jeder einzelnen Generation ist $\frac{t}{n}$, wobei t die Versuchszeit bedeutet.

Die Anlegung der primären und sekundären Platte geschah in diesen Versuchen auf folgende Weise. Es wurde eine Platinöse der zu untersuchenden Reinkultur in Fleischwasserpeptonlösung in 50 ccm steriler Kochsalzlösung übertragen. Hiervon kam 1 ccm in 50 ccm steriler Fleischwasserpeptonlösung. Aus dieser Verdünnung wurde mit 1 ccm die primäre Platte angelegt, zur Bestimmung der Größe der Aussaat, und nach einer gewisse Zeit dauernden Bebrütung mit gleicher Menge die sekundäre Platte zur Bestimmung der Ernte. Die Versuchszeit soll nicht mehr als 2 bis 5 Stunden betragen, da nach dieser Zeit bereits eine Erschöpfung des Nährbodens und eine Hemmung der Lebensenergie durch die Anhäufung schädigender Zersetzungsprodukte eintreten kann, wodurch die Generationsdauer natürlich verlängert wird. Auch das Alter der Ausgangskultur ist in gleichem Sinne von Einfluß auf die Generationsdauer. Nach Max Müller[97] und Hehewerth[61] muß man bei der Berechnung der Generationsdauer darauf Rücksicht nehmen, daß bei nicht ganz frischen Kulturen in einer initialen Periode die Fortpflanzung zunächst ausbleiben kann. Nur bei ganz jungen Kulturen beginnt die Fortpflanzung sofort.

Winterberg[161] und Rubner verwendeten die Thoma-Zeisssche Zählkammer, die sie mit der Aufschwemmung einer jungen Kultur in Aqua dest. füllten.

Die spontane Wachstumshemmung der Bakterien infolge Selbstvergiftung läßt sich mit Hilfe der Methode von Conradi & Kurpjuweit[36a] feststellen:

Eine Reihe von mit 10 ccm Löffler-Bouillon gefüllten Röhrchen wird mit je 1 Oese einer Bakterien-Bouillon beimpft, die man durch Verteilen von 1 Oese einer bei 37° gezüchteten 20 Stunden alten Agarkultur in 10 ccm Bouillon erhalten hat. Die Röhrchen kommen in den Brutschrank und werden in bestimmten Zeitabständen (nach 1, 4, 12, 24 Stunden) herausgenommen. Fallende Mengen der Bouillon werden in 2-proz. auf 40° abgekühlten Agar eingetragen und nach sorgfältiger Verteilung der stets 10 ccm enthaltenden Mischung in

Petrischalen gegossen. Sämtliche Platten bleiben, bis die letzte Röhre verarbeitet, im Dunkel und bei Kälte stehen, dann werden die Platten mit der gleichen oder einer anderen Bakterienart frisch beimpft.

C. Die Methoden zum Nachweis der Sporenbildung.

Die Sporen wurden zuerst von Petry[111] beobachtet. Mit Hilfe des Mikroskops läßt sich durch die Methode des hängenden Tropfens sowohl der Vorgang der Sporenbildung, als auch der Auskeimung der Sporen zu vegetativen Formen verfolgen, wie das Cohn[30] zum erstenmal gelang. Der Nachweis der Sporen in Dauerpräparaten geschieht durch Färbung mittels der oben angegebenen Methoden.

In einfach gefärbten Präparaten erscheinen die Sporen ungefärbt, aber auch selbst in sporenfreien Bakterien können, wie Buchner[20] gezeigt hat, ungefärbte vakuolenartige Stellen, die sich infolge von Kontraktion des Protoplasmas gebildet haben, Sporen vortäuschen.

Die Methode der färberischen Sporendarstellung ist eine weit unsicherere als die der Beobachtung der Sporenbildung und Auskeimung im hängenden Tropfen. Eine weitere Methode zum Nachweis der Sporen beruht auf der Tatsache, daß sie widerstandsfähiger als Bakterien sind. Man prüft daher das Verhalten der verdächtigen Bakterien gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. Bei Temperaturen, die die vegetativen Bakterienformen sicher zum Abtöten bringen, können Emulsionen des sporenhaltigen Materials ihre Keimfähigkeit noch bewahren. Dasselbe ist der Fall, wenn man auf die sporenverdächtige Bakterienaufschwemmung Antiseptica in einer Konzentration einwirken läßt, die sporenfreie Bakterien sicher tötet. Findet nach für die Vernichtung der vegetativen Formen genügend langer Einwirkung derartiger Agentien noch ein Wachstum statt, so kann daraus mit Sicherheit auf das Vorhandensein von Sporen geschlossen werden. Da es jedoch auch weniger widerstandsfähige Sporen gibt, so ist umgekehrt die Vernichtung der Keimfähigkeit durch die erwähnten Mittel kein Beweis für das Fehlen von Sporen.

Um Sporen zu erhalten, ist es nur nötig, die sporenbildende Art eine Zeit lang bei günstiger Temperatur fortzuzüchten, während man durch Tierpassage sicher ein sporenfreies Material gewinnt; im Tierkörper sind Sporen noch nicht gefunden. Man kann aber auch sporenfreie Bakterien bei niederen Temperaturen erhalten; so fand R. Koch[75], daß unter 16° der Milzbrand keine Sporen bildet; ebenso bilden Aëroben bei Luftmangel und Anaëroben bei Sauerstoffzutritt keine Sporen (Slupski[137], Jacobitz[66]). Endlich kann man durch Zusatz entwicklungshemmender Substanzen asporogene Rassen züchten. Behring[5] gelang das z. B. durch Züchtung in Salzsäuregelatine und in Rosolsäuregelatine.

Um Sporen frei von vegetativen Formen zu erhalten, setzt man das Material einer Temperatur aus, die die vegetativen Formen vernichtet ohne die Sporen abzutöten.

D. Methoden zur Bestimmung des Sauerstoffbedürfnisses.

Darüber, ob eine Bakterienart anaërob oder aërob ist, gibt unter Umständen schon die Stichkultur Aufschluß. Wachsen die Bakterien nur in den obersten Schichten des Stichkanals, so ist die Art streng

aërob, wachsen sie auch in tieferen Partien, so ist die Aërobiose eine fakultative, ist endlich nur in den untersten Teilen des Stichkanals ein Wachstum sichtbar oder erfolgt es nur unter strengem Luftabschluß in Wasserstoffatmosphäre usw., so ist die betreffende Bakterienart streng anaërob. Nicht bei allen aëroben Arten herrscht das gleiche Sauerstoffbedürfnis. Vielmehr sind die verschiedenen Arten auf eine verschiedene Sauerstoffspannung abgestimmt. Eine Methode, die dies demonstriert, ist von Engelmann[43], eine andere von Beijerinck[9] angegeben. Engelmann brachte in die Mitte eines mit verschiedenen Bakterienarten infizierten hängenden Tropfens eine belichtete, chlorophyllhaltige Alge. Diese scheidet bekanntlich Sauerstoff aus und bewegliche Bakterien sammeln sich je nach ihrer Sauerstoffspannung in engern oder weiteren konzentrischen Ringen um die Alge an.

Die Beijerinckscbe Methode beruht darauf, daß sich in flüssigen Nährmedien die Bakterien verschiedener Sauerstoffavidität in verschiedenen Schichten ansammeln („Bakterienniveaus"). Um das in mikroskopischen Präparaten zu demonstrieren, wurde durch Einschiebung eines Platindrahtes unter das Deckglas von einer Seite der Luft Zutritt gelassen. Es bilden sich alsdann, entsprechend der durch das verschieden abgestufte Sauerstoffbedürfnis der verschiedenen Arten bedingten Lagerung in verschiedener Entfernung von der O-Quelle „Atmungsfiguren", teils aus konzentrisch ringförmigen, teils aus flachen Bakterienansammlungen. Die Beobachtung kann bei schwacher Vergrößerung mit der Lupe vorgenommen werden.

Süpfle[146] wendet zur Ermittelung des Sauerstoffoptimums der Bakterien die folgende Methode an:

Die Messungen werden in einem Exsikkator vorgenommen, der in beliebiger, zu messender Weise evakuiert wird; das entstandene Vakuum wird durch Sauerstoff, der ebenfalls gemessen wird, ersetzt. Im Exsikkator (der in den Brutschrank gestellt wird) befindet sich die Petrischale mit Kultur. Der Versuch wird mehrere Male mit verschiedenen Sauerstoffmengen ausgesetzt und so das Sauerstoffoptimum für die betreffende Bakterienart ermittelt.

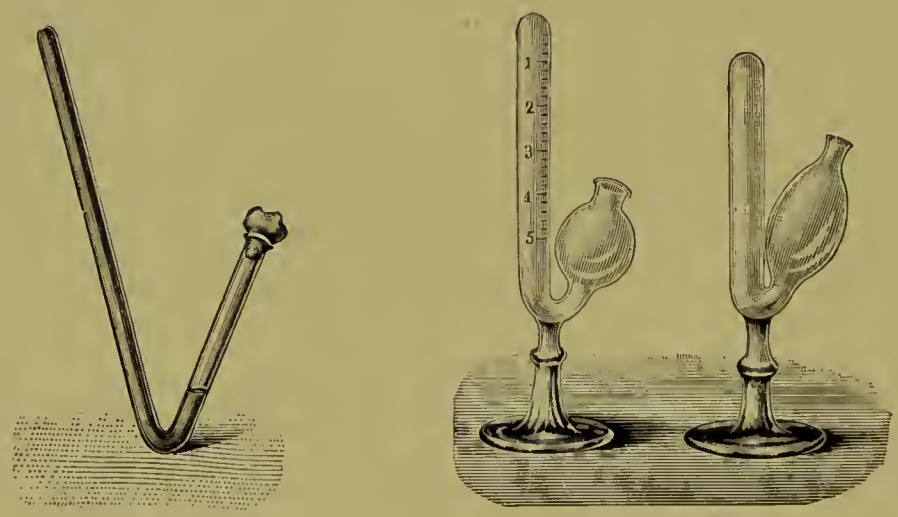
E. Methoden zur Bestimmung des Temperaturbedürfnisses.

Die für das Wachstum optimale Temperatur bestimmt man einfach auf die Weise, daß man Aussaaten der zu untersuchenden Bakterienart auf einem bestimmten günstigen Nährboden bei verschiedenen Temperaturen hält. Einen einigermaßen brauchbaren Anhalt über die zusagende Temperatur gibt die Wachstumsenergie. Zahlenmäßig kann man aus der Bestimmung der Kohlensäureausscheidung und Sauerstoffaufnahme nach dem Verfahren von Hesse einen Maßstab für die Energie der Lebensprozesse bei der betreffenden Temperatur finden. Durch die einfache Züchtungsmethode läßt sich auch die Wärmebreite, d. h. die niedrigste und höchste Temperatur, bei der die betreffende Bakterienart noch lebens- und fortpflanzungsfähig ist, bestimmen. Auf dem gleichen Prinzip beruht die Temperaturbestimmung für das Optimum der Sporenbildung und für ihre Breite. Die niedrigsten Temperaturen erreicht man durch flüssige Luft; niedere Grade bis zu 0^0 und etwas darunter dadurch, daß man die Kulturen in Eis- oder Kältemischungen bringt. Im Eisschrank

herrschen Temperaturen von 5 bis 8°. Temperaturen bis zur Zimmertemperatur sind in kühlen Kellerräumen oder in Gefäßen mit doppelter Wandung, durch die man kaltes Wasser zirkulieren läßt, vorhanden. Zur Erzeugung von Temperaturen über Zimmertemperatur dienen Thermostaten.

F. Methode des Nachweises gasförmiger Stoffwechselprodukte der Bakterien.

Der qualitative Nachweis von **Kohlensäure,** die bei der Gärung des Zuckers auftritt, geschieht am besten mit Hilfe der gebräuchlichen Gärungsröhrchen, wie sie von Dunbar[38] (Fig. 132a) angegeben sind oder mit den gewöhnlich für die Harngärung benutzten Kölbchen, die Smith[139] (Fig. 132b) für bakteriologische Zwecke zuerst angewandt hat. Die etwa bis zur Hälfte des unteren Schenkels mit der Nährlösung gefüllten sterilen Röhrchen werden nach Watteverschluß im Dampf sterilisiert. Die dabei in der Kuppe des langen Schenkels eingedrungenen geringen Luftmengen werden durch vorsichtiges Neigen des Röhrchens ausgetrieben. Nach der Abkühlung erfolgt Impfung mittelst Platindrahtes in den kurzen Schenkel, danach wieder Watteverschluß und Bebrütung der Röhrchen. Das Gas sammelt sich in der Kuppe des langen Schenkels.



a b

Fig. 132.

Burri & Düggeli[25] benutzen zum Nachweis der Gärungsgase 40—50 cm lange dickwandige sterile und mit Wattebausch versehene Glasröhren. In diese werden 10 ccm flüssigen, 42° warmen, eben beimpften 2-proz. Traubenzuckeragars hineingegossen und in kaltem Wasser schnell zur Erstarrung gebracht. Die so erhaltene Agarschicht wird mit 3—4 ccm 60—80° heißen „Deckagars“ (1000 g Wasser + 30 g Agar) überschichtet und in Wasser gekühlt. Die Röhre kommt jetzt 24—48 Stunden in horizontaler Lage in den Brutschrank. — Je nach dem Grade der Gasbildung wird der „Deckagarkolben“ langsam nach der Mündung der Röhre verschoben. Die Strecke der Verschiebung wird gemessen und das Volumen berechnet.

Seiffert[134] gießt in das bis zu bestimmter Höhe mit Gelatine gefüllte Reagenzglas sterilisiertes Paraffin (Schmelzpunkt 45 bis 50°) auf. Bei der Gasentwickelung wird der Paraffinpfropf in die Höhe getrieben.

Der Apparat von Weissenberg[158] besteht aus einem zylindrischen Glasgefäß, das mit etwa 225 ccm konzentrierter Kochsalzlösung gefüllt ist. In diese Flüssigkeit ist ein unten offener, oben geschlossener Tauchzylinder hineingestülpt, der vermittels einer Schnur, die über einen Galgen mit zwei Rollen geführt ist, mit einem Geleitschlitten in Verbindung steht, an dem eine Schreibfeder angebracht ist. Beim Heben des Tauchzylinders sinkt der Geleitschlitten mit der Feder, beim Fallen hebt er sich. Die Bewegungen werden auf eine sich drehende Registriertrommel übertragen. Der Apparat wird vor Erschütterung geschützt in einen Glaskasten in der Nähe des Brutschrankes aufgestellt, in dem sich das Kulturgefäß befindet. Das in diesem sich entwickelnde Gas wird mittels eines Gasrohres durch die seitliche Ventilationsöffnung des Brutschrankes herausgeführt und gelangt mittels einer Röhrenüberführung in den schwimmenden Tauchzylinder, verdrängt eine entsprechende Menge Wasser aus demselben, wodurch er steigt. Ein in dem gleichen Behälter befindlicher angefeuchteter Schwamm sorgt für genügende Feuchtigkeit der Luft. Durch einen Gashahn der Zuleitungsröhre kann je nach der Beendigung des Versuches das angesammelte Gas entfernt werden.

Die Bildung von **Schwefelwasserstoff** dokumentiert sich häufig schon durch den intensiven charakteristischen Geruch. Die Fähigkeit der Schwefelwasserstoffbildung kommt, wie Rubner[121], Petri & Maassen[113] und andere gezeigt haben, einer großen Anzahl von Bakterien zu und ist in der Quantität in gewissen Grenzen abhängig von der Zusammensetzung des Nährbodens. Die Bildung des H_2S im infizierten Tierkörper ist von Petri & Maassen zuerst nach der Methode vom Hoppe-Seyler spektroskopisch beobachtet worden. Da der Nachweis jedoch auf diese Weise nicht stets sicher gelingt, so verfuhren die genannten Autoren auch so, daß sie Organstücke in sterile Reagenzgläser brachten und zwischen Wattepfropf und Glaswand einen Streifen von Papier einlegten, der mit einer Lösung von basisch-essigsaurem Blei oder mit alkalischer Bleilösung getränkt war. Um einen Zutritt von Schwefelwasserstoff von außen zu vermeiden, wurden die Röhrchen mit einer Gummikappe geschlossen. Die Schwärzung des Bleipapiers zeigte die Gegenwart von Schwefelwasserstoff an. Diese Reaktion ist sehr empfindlich.

In gleicher Weise erfolgt der Nachweis des H_2S in Flüssigkeitskulturen mittels Bleipapiers. Man kann auch, statt Bleipapier zu verwenden, das untere Ende des Wattepfropfs mit der betreffenden Bleilösung tränken.

Zum Nachweis der Schwefelwasserstoffbildung in festen Nährböden dient ein Zusatz von Bleizucker zum fertigen Agar (1 Teil auf 1000 Teile Agar) (Morris[96]) oder Zusatz von Bleiweiß (Bleikarbonat) bis zur gleichmäßig schneeweißen Verfärbung des Agars (Beijerinck[10]). Für die Gelatine nimmt man zweckmäßiger eine Eisenlösung (Fromme[49]), die folgendermaßen gewonnen wird: Aus Eisenchlorid mit Kali- oder Natronlauge frisch gefälltes Eisenoxydhydrat wird mit destilliertem Wasser ausgewaschen und in orga-

nischer Säure gelöst (nicht Essigsäure). Die Lösung wird der fertigen Gelatine vor der Sterilisation zugesetzt.

Werden Eier als Nährböden benutzt, so erfolgt der Nachweis der Schwefelwasserstoffbildung nach Petri & Maassen mittels Bleipapier auf folgende Weise. Die Eier werden zunächst ungeimpft in Bleipapier eingewickelt und in ein cylindrisches Gefäß zwischen zwei Wattelagen eingepackt. Ueber die Watte kommt nochmals Bleipapier. Ist bei dieser Art der Aufbewahrung in einigen Tagen kein Schwefelwasserstoff nachweisbar, so erfolgt die Infektion und abermalige Verpackung in der gleichen Weise.

Der **quantitative Nachweis flüchtiger Stoffwechselprodukte** erfolgt nach Ableitung derselben nach den üblichen gasanalytischen Methoden. Zum Sammeln der zu diesem Zweck nötigen größeren Gasmengen sind besondere Apparate angegeben worden. Pasteur[104] benutzte Kolben mit einem langen, durch einen Gashahn luftdicht geschlossenen Zuleitungsrohr und einem S-förmig gebogenen Ansatzrohr (Fig. 133). Der Kolben ist mit der Nährlösung gefüllt und das Ansatzrohr taucht in eine Schale, die die gleiche Lösung enthält. Es wird nun die Flüssigkeit im Kolben und die in der Schale gleichzeitig erhitzt, wodurch alle Luft aus dem Kolben entfernt wird. Der Dampf treibt die Flüssigkeit aus dem Ballon heraus und in den luftleeren Raum strömt von neuem Flüssigkeit aus der Schale. Auf diese Weise erhält man eine luftfreie Flüssigkeit in einem Vakuum. Man bringt nunmehr das Ableitungsrohr für die Gase unter steriles Quecksilber, impft, indem man die infizierte Flüssigkeit, die sich in dem über dem Hahn gelegenen Teil des Zuleitungsrohrs befindet, schnell einschießen läßt und bringt das Ganze in den Brutschrank.

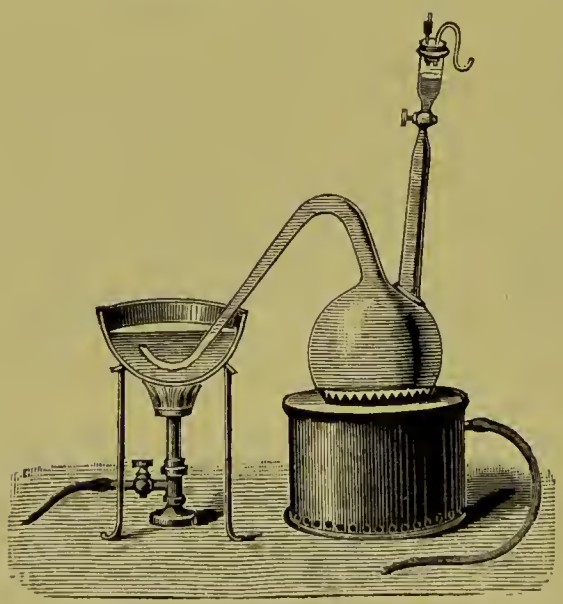


Fig. 133.

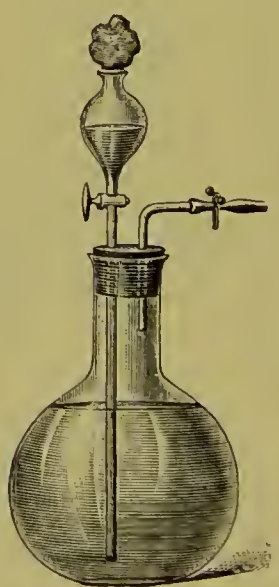


Fig. 134.

Auf demselben Prinzip beruht ein von Botkin[18] (Fig. 134) angegebener Apparat, bei dem Zu- und Ableitungsrohr mittels eines doppelt durchbohrten Kautschukpfropfens in den Kolben, in dem sich Nährflüssigkeit befindet, eingelassen sind. Ueber dem Hahn des

Zuleitungsrohres befindet sich ein Scheidetrichter, der das Material für die Impfung der Nährflüssigkeit aufnimmt. Der Apparat wird mit offenen Hähnen im Dampf sterilisiert, darnach erfolgt Abschluß, Impfung und weitere Behandlung in der gleichen Weise wie vorher. Andere Apparate, die den gleichen Zwecken dienen, sind von Nencki und von A. Koch[74] angegeben worden.

Hesse[63] hat zu quantitativen Versuchen über Bakterienatmung eine Versuchsanordnung zusammen mit Hempel ausgearbeitet, die es gestattet, mit kleinen Gasmengen zu arbeiten, und binnen einer Viertelstunde schon den gasförmigen Inhalt eines Kulturgefäßes auf Kohlensäure und Sauerstoff zu untersuchen.

G. Methode zum Nachweis von Indol.

Zum Nachweis der Indolbildung versetzt man 10 ccm einer in Peptonbouillon gewachsenen, 24stündigen Kultur mit 1 ccm einer schwachen Lösung von Kaliumnitrit und einigen Tropfen Schwefelsäure. Es tritt alsdann eine Rotfärbung ein, die nach Salkowski[127] auf die Bildung von Nitrosindol zurückzuführen ist, eines Farbstoffes, den Indol und Säure in Gegenwart von Nitriten bilden. Die Bildung des Indols erfolgt ausschließlich aus dem Pepton (Proskauer & Voges[117]).

Als ein geeignetes Nährmedium für den Nachweis der Indolbildung schlägt Bleisch[115] folgende Lösung vor:

Pepton siccum (Witte)	2,0
Natrium chlor. purissim.	0,5
Aqu. dest.	100,0
sol. Kal. nitric. puriss.	(0,08 zu 100,0) gtts XXX—L.

In Cholerakulturen tritt diese Reaktion bei dem bloßen Zusatz von Schwefelsäure auf, die man vorsichtig an der Innenwand des Reagenzglases herunterlaufen läßt, so daß sie sich unterschichtet. An der Berührungstelle mit der Nährflüssigkeit entsteht ein rotgefärbter Ring (Cholerarotreaktion). Die Tatsache, daß es bei Cholerabakterien und einigen andern gelingt, die Nitrosindolreaktion auch ohne Zusatz von Nitriten auszuführen, beruht darauf, daß die betreffenden Bakterien die Eigenschaft haben, geringe Mengen von Nitrat, die nach Untersuchungen von Petri[112] dem Nährmedium anhaften und besonders im Witteschen Pepton jedenfalls enthalten sind, zu Nitrit zu reduzieren. Bei Zutritt von Säure allein tritt alsdann die Reaktion mit dem gebildeten Indol ein. Andererseits aber kann die Verwendung nitrithaltiger Säure oder Nährboden die Cholerarotreaktion vortäuschen. Daher ist auf die Benutzung nitritfreier Säure besonders zu achten. Die Cholerarotreaktion wurde zuerst von Pöhl[115], von Bujwid[23] und von Dunham[39] unabhängig voneinander gefunden. Dunham verwandte zuerst Schwefelsäure und Kulturen in reiner Peptonlösung. Es eignen sich auch an Stelle der Schwefelsäure andere Mineralsäuren. Da nach Liebreich[190] Schwefelsäure für sich allein Nitrate zu Nitriten reduzieren kann, so empfiehlt er Ersatz durch Weinsäure oder Oxalsäure. In zuckerhaltigen Nährböden ist die Indolbildung infolge der Säureproduktion gehemmt (Gorini[55], Smith[140], Peckham[109], Seelig[133]). Nach Bleisch ist ein Ueberschuß von Nitraten im Nährmedium für die Reaktion hinder-

lich. Der günstige Zeitpunkt der Reaktion liegt zwischen 24 bis 48 Stunden. Bei schwacher Reaktion kann man den Farbstoff zur deutlicheren Sichtbarmachung mit Amylalkohol ausschütteln.

A. Boehme[16] wendet die Ehrlichsche Indolreaktion für bakteriologische Zwecke an:

Lösung I.	Paradimethylamidobenzaldehyd	4,0
	Alkohol (96-proz.),	380,0
	Salzsäure, konz.,	80,0

Lösung II. Kaliumpersulfat in gesättigter wäßriger Lösung (als Oxydationsmittel). Zu 10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit (Bouillonkultur) werden 5 ccm der Lösung I, dann 5 ccm der Lösung II gesetzt und gemischt: Bei Anwesenheit von Indol Rotfärbung.

Steensma[144] empfiehlt folgende Methode zum Indolnachweis: In 2 Teile Kulturflüssigkeit gibt man 1 Teil Aether, schüttelt und trennt den Aether im Scheidetrichter von der Kulturflüssigkeit. Der Aether wird filtriert, dem Filtrat etwas Alkohol zugesetzt und mit dem Reagens (2-proz. Lösung von Dimethylaminobenzaldehyd in Salzsäure) in weitem Reagenzrohr zur Verdampfung des Aethers geschüttelt. — Bei Anwesenheit von Indol wird die Flüssigkeit rot gefärbt. Durch Hinzufügen von 1 oder 2 Tropfen Natriumnitrit (0,5 Proz.) wird die rote Farbe zuerst intensiver und verschwindet dann bald.

Marshall[92] empfiehlt als quantitatives Reagens auf Indol eine kalorimetrische Messung mit Paradimethylamidobenzolaldehyd. Die Ausgangslösung erhält man durch Auflösung von 0,05 g Indol in 5 ccm absoluten Alkohols. Dann wird mit destilliertem Wasser auf 500 ccm verdünnt. Zur Prüfung auf Indol nimmt man 5 ccm der Lösung (nachdem man auf je 100 ccm der Lösung 1 ccm absoluten Alkohols zugefügt hat), gibt sie in eine Neslersche Röhre und verdünnt mit dest. Wasser auf 50 ccm. Dann fügt man hinzu: 2 ccm Paradimethylamidobenzolaldehyd-Lösung und 2 ccm Kalium persulfat. (Rote Farbe zeigt das Vorhandensein von Indol an.) Die Farbe muß übereinstimmen, wenn verschiedene Mengen der Ausgangsindollösung ähnlich behandelt werden. Vor dem Vergleich soll die Mischung 1 Stunde stehen. —

Morelli[95] verwertet die Rotfärbung der Oxalsäure bei Gegenwart von Indol in folgender Weise: In eine warmgesättigte Oxalsäurelösung wird ein Streifen Fließpapier gebracht. Beim Erkalten bleibt es mit fester Oxalsäure gänzlich belegt, da diese in der Kälte weniger löslich ist als in der Wärme. Der sterilisierte Papierstreifen wird dann in der Atmosphäre des Reagenzglases aufgehängt. Bei Anwesenheit von Indol tritt Rotfärbung des Streifens ein.

Selter[135] wählt für die Reaktion folgende Nährflüssigkeit: 10-proz. Peptonlösung mit Zusatz von 0,5 Proz. Natriumphosphat und 0,1 Proz. Magnesiumsulfat.

Escallon & Sigre[44] fügen zum Nachweis von Indol zu 10 ccm Kultur 10 ccm einer frischen alkoholischen Furfurollösung (1 auf 50), dann tropfenweise reines HCl; enthält die Kultur Indol, so tritt eine orangegelbe Färbung ein; Erwärmung beschleunigt die Reaktion.

Buard[19] setzt zu 10 ccm der Kultur in Peptonwasser (nach 15- bis 20-stündigem Aufenthalt im Thermostaten) 5 bis 6 ccm absoluten

Alkohols, mischt und gibt 1 ccm alkoholischer Vanillinlösung (0,02-proz.) und 3 ccm reiner Salzsäure hinzu. Mit Indol erhält man eine Rosafärbung, die nach einigen Stunden in Magentarotfärbung oder Rotviolettfärbung übergeht; bei leichter Erwärmung geht die Reaktion schneller vor sich.

Nonotte & Demanche[102] setzten zu einer Kultur (Peptonwasser) 1 ccm einer Lösung von KNO_3 ($^1/_{10}$-proz.) und 8 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure. Die Reaktion ist dann besonders empfindlich (Indolverdünnung 1:4000000), wenn man den oberen Teil der Flüssigkeit bis zu Siedetemperatur erhitzt.

H. Methode zum Nachweis der Bildung von Säure und Alkali.

Eine Einteilung der Bakterien in Säure- und Alkalibildner läßt sich im strengen Sinne nicht vornehmen. Die Fähigkeit der Erzeugung der einen oder anderen Reaktion im Nährmedium ist vielfach abhängig von der Zusammensetzung des Nährbodens und von seiner Eigenreaktion. Sind gärungsfähige Substanzen im Nährboden vorhanden, so kann eine Säurebildung durch Bakterien eintreten, die beim Fehlen derartiger Stoffe ausbleibt. Derselbe Bacillus kann aus zwei verschiedenen Körpern seines Substrats Säure und Alkali bilden, und die Endreaktion hängt dann nur von dem verschiedenen Mengenverhältnis der gebildeten Stoffe ab oder, wie ohne weiteres verständlich, von dem ursprünglichen Reaktionsgrad des Nährmittels. Immerhin sind die Methoden des Nachweises der Reaktionsänderung von Wichtigkeit für biologische und diagnostische Untersuchungen. Der Nachweis geschieht mit Hilfe von Indikatoren, die dem Nährboden zugesetzt werden, nur qualitativ, oder durch nachträgliche Titration der gebildeten Säure oder Alkali auch quantitativ. Für die Titration von Säure oder Alkali in Nährlösungen ist das Phenolphthaleïn ungeeignet. Man benutzt Lackmuspapier oder Rosolsäure.

Buchner[21] hat zuerst durch Zusatz von Lackmuslösung zu Zuckerpeptonfleischextraktlösung Bakterien auf die Bildung von Säure oder Alkali hin untersucht. Bei dieser Methode mit flüssigem Nährboden stört jedoch die gleichzeitig reduzierende Wirkung der Bakterien, die durch den Peptongehalt des Nährbodens begünstigt wird, ein Uebelstand, dem schon Behring[4] dadurch zu begegnen suchte, daß er feste, mit Lackmus gefärbte Nährböden benutzte. Petruschky[114] verbesserte die Methode durch Anwendung seiner Lackmusmolke, deren Herstellung sich folgendermaßen gestaltet:

Frische Milch wird mit soviel verdünnter Salzsäure versetzt, daß das Kasein ausfällt. Filtration. Neutralisierung des Filtrats mit Natronlauge oder Sodalösung. 2 Stunden kochen im Dampftopf. Abermalige Filtration. Die Molke muß nach dem Kochen wasserhell sein und genau neutral. Zusatz von 5 ccm einer Lackmuslösung auf 100 Molke. Es entsteht so eine Flüssigkeit von neutralvioletter Farbe, in der säurebildende Arten eine Rotfärbung, alkalibildende eine Blaufärbung bewirken.

Frégonneau[48] ersetzt den Lackmus durch Methylorange.

Kaufmann[70] gelang der Nachweis der Säure- resp. der Alkalibildung durch Züchtung in Jequiritiinfus: 10 g Jequiritisamen werden

durch Zerstampfen im Mörser von den Schalen befreit, mit 100 ccm Wasser übergossen und 2 Stunden im Dampf sterilisiert. Danach Filtration. Die neutral reagierende Flüssigkeit wird in Reagenzgläser gefüllt, sterilisiert und ist direkt als Nährboden verwendbar. Sie kann mit gelatinierenden Zusätzen zu festen Nährböden verarbeitet werden, was sich jedoch nach Kaufmann wenig empfiehlt. Alkalibildner färben die schwach gelb gefärbte Flüssigkeit grün, während Säurebildner sie entfärben.

Im Beijerinckschen[8] Nährboden lösen säurebildende Arten die zugesetzten Karbonate: 20 g Hefe werden mit 100 ccm Leitungswasser gekocht, dazu 8 g Gelatine oder $^3/_4$ g Agar und 3 bis 10 g Glukose. Nach dem Kochen filtrieren und Zusatz einiger Tropfen einer Suspension von Schlemmkreide in Wasser. Ausgießen zu Platten. Die Platten sind gleichmäßig milchigweiß getrübt; diejenigen Bakterienarten, die Säure bilden, hellen jedoch die Gelatine durch Lösung des Karbonats auf. Gleichzeitig vorhandene alkalibildende Arten veranlassen Defekte an den Diffusionsfeldern der säurebildenden.

Eine Methode zum Säurenachweis, die auf der Ausfällbarkeit des Eiweiß durch Säure beruht, ist von Hanna[60] angegeben. Er verdünnte Ochsenserum mit der zehnfachen Menge destillierten Wassers, sterilisierte im Dampf und setzte der Nährlösung Zucker zu. Bei der Züchtung säurebildender Arten in dieser Nährlösung fällt das Eiweiß aus.

Berghaus[11] verwendete als Indikator die Harnsäure: 0,73 g Lithiumkarbonat und 1,68 g reine Harnsäure werden in 100 ccm Wasser gebracht, filtrieren oder absetzen lassen. Hiervon werden 15 ccm zu 75 ccm schwach alkalischen 2-proz. Nähragars (mit 1 Proz. Traubenzucker) gesetzt und noch 10 ccm Aqua dest. hinzugefügt. Säurebildner zeigen die typischen Harnsäurekonglomerate.

Quantitative Untersuchungen wurden von Sommaruga[142] angestellt; er titrierte in vorher genau auf ihren Alkaleszenzgrad geprüften Nährmedien nach erfolgtem Wachstum mit Hilfe von Normallösungen unter Verwendung von wäßriger Rosolsäure als Indikator. Die Titration wurde durch Uebertitrieren mit Säure und durch Zurücktitrieren mit Alkali ausgeführt, weil die Rotfärbung der Rosolsäure bei Eintritt der Alkaleszenz schärfer zu erkennen ist als die Entfärbung bei Säurezusatz.

I. Methoden zum Nachweis des Reduktionsvermögens der Bakterien.

Ebenso wie der Nachweis von Säure und Alkali, wird das Reduktionsvermögen der Bakterien durch ihr Verhalten gegenüber Farben geprüft. Man muß dabei Zusätze solcher Farben zum Nährmedium verwenden, die ungiftig sind. Nach Ehrlich[40] sollten es Farbstoffe sein, die an sich Oxydationsstufen sind und die Eigenschaft haben, durch Reduktion ein farbloses Leukoprodukt (Küpe) zu bilden, das durch den Einfluß oxydierender Mittel und auch schon durch die Berührung mit dem Luftsauerstoff wiederum die ursprüngliche Farbe erhält (Verküpung). Es ist aus letzterem Grund im allgemeinen zur Prüfung des Reduktionsvermögens eine Versuchsanordnung vorzuziehen, bei der der Luftzutritt kein ungehinderter ist, und es werden sich daher Kulturen auf festen Nährböden, even-

tuell mit Ueberschichtung der Oberfläche besser eignen als gewöhnliche Reagenzglasbouillonkulturen. Will man mit flüssigen Nährmedien arbeiten, so legt man nach Smith[138] die Kulturen besser in Gärungskölbchen an, deren geschlossener Schenkel ganz von der Luft abgeschlossen ist.

Es ist bei Reduktionsversuchen auch darauf zu achten, daß den verschiedenen Nährmedien selbst eine reduzierende Eigenschaft zukommt. Dies hat Spina[143] zuerst für die Gelatine gezeigt, die in sterilem Zustand bei Zusatz konzentrierter Lösung von Methylen- oder Indigblau, wenn auch sehr langsam, von unten nach oben sich entfärbt. Das gleiche gilt nach Smith für Bouillon, besonders gegenüber Methylenblau, während Lackmus nur bei Anwesenheit von Traubenzucker oder Fleischzucker reduziert wird. Dieser Farbstoff erleidet nach Fr. Müller[98] eine Reduktion durch Agar.

Da die verküpenden Farbstoffe sich ferner besonders leicht bei der durch die Sterilisation der Nährmedien bedingten hohen Temperatur reduzieren, so setzt man erst den fertigen Nährböden einige Tropfen der konzentrierten wäßrigen Farblösung zu. Dies ist angängig, da konzentrierte Lösungen der betreffenden Farbstoffe stark bakterizide Eigenschaften haben und daher keimfrei sind. Auf die keimtötende Eigenschaft gewisser Farbstoffe ist bei der Bereitung gefärbter Nährböden bezüglich der Menge des zuzusetzenden Farbstoffs Rücksicht zu nehmen. Ferner sind die fertigen Nährböden vor Licht geschützt aufzubewahren, da nach Müller das Sonnenlicht eine reduzierende Wirkung entfaltet.

Zur Demonstration des Reduktionsvermögens sind eine große Reihe von Farbstoffen in der bakteriologischen Technik verwandt worden.

Pöhl[115] fügte 0,05 Proz. Ferrichlorid und Ferricyankalium zur Nährlösung, in der unter Umständen die Reduktion des Ferricyankaliums zu Ferrocyankalium (Berlinerblaubildung) eintrat. Da jedoch dieser Prozeß nur in saurer Lösung vor sich geht, so ist diese Methode nicht für alle Bakterien brauchbar. Spina verwandte zum Nachweis Methylenblau. Er färbte die Nährböden mit einigen Tropfen konzentrierter, sterilisierter Lösungen dieses Farbstoffes. Fr. Müller nimmt 10 ccm Methylenblaulösung 1:1000 pro Liter Agar. von Rozsahegy[119] empfahl nach Prüfung einer großen Reihe von Anilinfarben außer Methylenblau noch Fuchsin. Buchner[21] und nach ihm Cahen[26] benutzten als Zusatz Lackmusfarbstoffe. Behring[6] empfahl statt der Lackmusgelatine das Lackmusagar, da bei der höheren Temperatur die Reduktion besser vor sich geht. Er gab zu 1 l Agarnährboden einen Zusatz von 40 ccm einer nach Berthelot & Fleuriet von Erdalkalien befreiten, starken, konzentrierten Lackmustinktur. Fr. Müller verwendet 30 ccm einer wäßrigen konzentrierten Lackmuslösung pro Liter Agar.

Methylenblau ist für Reduktionsversuche geeigneter als Lackmus, weil es leicht reduziert wird, leicht wieder verküpbar ist und weil ferner seine Konstitution bekannt ist (Michaelis[94]).

Hingegen leistet der Lackmusfarbstoff gegenüber der Reduktion durch die meisten Bakterienarten mehr Widerstand (Smith, Fr. Müller), wenn auch einzelne Arten Lackmus leicht reduzieren. Die Konstitution dieses Farbstoffes ist unbekannt.

Kitasato & Weyl[71] empfahlen indigschwefelsaures Natron. Es ist jedoch nach Wolff[163] ungeeignet, da es auch durch Oxydation ein farbloses Produkt bilden kann.

Noeggerath[101] schlug Zusatz eines Farbengemisches zum Nährboden vor, dessen Bestandteile den Spektralfarben möglichst entsprechen. Die Bakterien sollen unter Umständen aus dieser Mischung neue Farben bilden, die in den ursprünglichen Komponenten nicht enthalten waren.

v. Sommaruga[142] empfahl Rosolsäure, die er in einer Menge von 0,003 zu Bouillon, 0,0045 zu Gelatine und 0,0068 zu Agar auf je 10 ccm des Nährbodens zusetzte.

Nach Rotberger[118] wird Neutralrot von reduzierenden Bakterienarten entfärbt. Er versetzte verflüssigte Agarröhrchen mit zwei bis drei Tropfen einer sterilen konzentrierten Lösung von Neutralrot (Toluolenrot) und impfte die betreffenden Bakterien aus Bouillonkulturen ein. Typhus z. B. läßt die Farbe des Nährbodens unverändert. Durch Coli wird die Farbe zuerst in eine fluoreszierende verwandelt und dann aufgehellt.

A. Wolff, sowie Scheffler[128] haben die Methode von Rotberger noch dadurch verbessert, daß sie, statt der von diesem verwandten Schüttelkulturen, Stichkulturen anlegten und durch Zusatz von Traubenzucker zum Nährboden die Reaktion beschleunigten:

100 flüssiger Agar.
0,3 Traubenzucker.
1 ccm konzentrierte, wäßrige Neutralrotlösung.

Neisser & Wechsberg[100] gründen auf das Reduktionsvermögen der Bakterien und anderer Zellen eine Methode der Beobachtung der vitalen Energie (Bioskopie). Die Zellen (Bakterien), deren Energie geprüft werden soll, werden in etwa 3 Teilen Kochsalzlösung, die mit stark verdünnter Methylenblaulösung versetzt ist, in Reagenzgläser gebracht. Luftabschluß erfolgt durch Ueberschichten mit flüssigem Paraffin. Die Entfärbung des Methylenblaus erfolgt proportional dem Reduktionsvermögen, das seinerseits ein Maßstab für die allgemeine vitale Energie ist. Kontrollproben sind stets erforderlich, zumal auch das Reduktionsvermögen unter Umständen bei toten Zellen vorhanden sein kann.

W. Schultze[132] hat zum Nachweis von Reduktions- und Oxydationswirkungen der Bakterien folgende Methode empfohlen:

Eine alkalische Lösung von α-Naphthol (1 g α-Naphthol und 100 ccm Wasser) werden bis zum Kochen erhitzt, wobei das α-Naphthol schmilzt und teilweise in Lösung geht. Während des Kochens setzt man dann soviel konzentriertes NaOH tropfenweise zu, bis alles α-Naphthol gelöst ist und nach dem Erkalten noch weiter soviel NaOH, bis die über dem teilweise wieder ausgefällten α-Naphthol stehende Flüssigkeit nicht mehr merklich getrübt ist, sondern einen klaren, leicht bräunlichen Farbton erlangt hat. Mit der so hergestellten Lösung werden gleiche Teile einer 1-proz. wäßrigen von p-Nitrosodimethylanilin (Merck) gemischt, das Ganze filtriert, mit $^2/_3$ Volumen Agar versetzt und in Petrischalen ausgegossen. — Die Ausstriche auf der Oberfläche des gelb gefärbten Nährbödens nehmen bei Reduktion einen blau-grünen bis blauen Farbton an.

(Zum Nachweis der Oxydationswirkung wird die oben beschriebene Lösung mit gleichen Teilen einer 1-proz. wäßrigen Lösung von

Dimethyl-p-phenylendiamin gemischt, filtriert und, mit 3 Teilen Agar versetzt, zu Platten gegossen. — Bei Oxydation Bläuung der Ausstriche. — Dieser Agar eignet sich auch zur vitalen Färbung der Bakteriengranula.)

Den bisher besprochenen zur Reduktion verwandten organischen Farbstoffen steht das Natrium selenosum gegenüber, das, an sich ungefärbt, erst durch die Reduktion eine Farbe annimmt. Es wurde von Klett[73] eingeführt. Es wird in 2-proz. Lösung sterilisiert in geringen Mengen (eine Oese bis 10 Tropfen) dem sterilen Nährboden zugesetzt. Bei gleichzeitiger Sterilisierung mit dem Nährmedium würde eine Reduktion durch die organischen Substanzen des letzteren statthaben. Reduzierende Bakterien bewirken auf diesem Nährboden eine Reduktion des Salzes zu metallischem Selen, das durch seine ziegelrote Farbe hervortritt. In gleicher Weise wie Natrium selenosum ist auch Na tellurosum anwendbar. Durch diese Substanzen findet jedoch für manche Bakterienarten eine Wachstumshinderung statt.

Gosio[56] versetzte zum Nachweis lebender Bakterien die zu untersuchenden Flüssigkeiten mit kleinen Mengen Kalium tellurosum: Sind lebende Bakterien vorhanden, so wird das Salz reduziert und es treten schwarze Pünktchen oder Trübungen auf.

Speziell zur Erkennung der Reduktion von Nitraten zu Nitriten (durch den Vibrio Cholerae) bedient man sich der Nitrosoindolreaktion: Rotfärbung bei Zusatz von Schwefelsäure; oder der Griessschen Sulfanilmethode, die Pelz[110] für quantitative Bestimmungen kalorimetrisch verwertete:

Zusatz folgender Lösung: Mischen gleicher Teile:

I. 0,5 Sulfanilsäure in 150 g verdünnter Essigsäure.

II. 0,1 α-Naphthylamin mit 20,0 Wasser gekocht und mit 150 g verdünnter Essigsäure versetzt.

Sofortige intensive Rotfärbung bei Gegenwart von Nitriten.

Die Nitron-Methode von Pelz beruht auf folgender Ueberlegung: Nitron bildet mit Salpetersäure und salpetriger Säure unlösliche Salze. Indem man nun einmal das gebildete Nitron-Nitrit durch Wasserstoffsuperoxyd in Nitron-Nitrat überführt, ein andermal es durch Hydrazinsulfat zerstört und beide Male wiegt, kann man aus der Differenz das ursprünglich gebildete Nitrit berechnen.

K. Methoden des Nachweises von Enzymen.

Zum sicheren Nachweis einer enzymatischen Wirkung ist es auszuschließen, daß die betreffende Spaltung eine Funktion des lebenden Zellprotoplasmas ist. Es ist daher nötig, vor der Untersuchung auf von Bakterien gebildete Enzyme, die Keime selbst abzutöten oder die betreffenden Stoffe von ihnen zu trennen und in sicher keimfreien Lösungen zu benutzen. Bitter[13] bewirkte die Trennung durch Erwärmung der Kultur auf 60°, eine Temperatur, die das Leben der Bakterien, nicht aber ihre Enzyme vernichtet. Auch Lander, Brunton & Macfadyen[84] empfehlen diese Methode. Sie sterilisierten Gelatinekulturen bei der angegebenen Temperatur und ließen die enzymhaltigen, von lebenden Bakterien befreiten Kulturen auf die zu untersuchenden Substrate einwirken.

Fermi[45] schaltete die Funktion der lebenden Zellen bei seiner Versuchsanordnung außer durch die vorher erwähnten Methoden auf die Weise aus, daß er bei der Prüfung auf Enzyme Substrate verwandte, die mit Sublimat 1—2 Prom., Karbolsäure 3 Proz., Salicylsäure (gesättigte Lösung), oder Thymol versetzt waren. Nach Lander, Brunton & Macfadyen soll jedoch der Zusatz von Antisepticis mehr als die Erwärmung auf 60° auch die Enzyme selbst schädigen.

Die direkte Isolierung der Fermente wurde zuerst von Wortmann[162] versucht durch Extraktion eines Bakteriengemenges und Fällen mit Alkohol. Doch ist seine Versuchsanordnung nicht ganz einwandfrei.

Lander, Brunton und Macfadyen isolierten das peptische Ferment durch Fällung von Bouillonkulturen mit absolutem Alkohol. Aufnahme des Niederschlages mit Wasser; abermalige Alkoholbehandlung und Lösung im Wasser. Aehnlich isolierte Kalischer[69] ein Labferment und peptisches Ferment.

Cohn[31] isolierte ein labähnliches Ferment auf folgende Weise. Die das betreffende Enzym besitzenden Bakterien werden in sterilisierter Milch 10 Tage lang gezüchtet, dann wird das Ganze mit Wasser vermischt und durch Chamberlandkerzen filtriert. Durch Ausfällung mit Salz wird das Ferment gewonnen, das durch Dialyse von Salz noch befreit werden kann.

Der Nachweis der bakteriellen Enzyme erfolgt im wesentlichen nach den in der physiologischen Chemie üblichen Methoden. Zum Nachweis eines peptischen Enzyms benutzt man die Eigenschaft derartiger Körper, Eiweiß in lösliche Albumose und Pepton überzuführen. Nach Fermis Vorgang bringt man das Enzym mit 5—10-proz. Gelatine zusammen, die in Reagenzgläsern erstarrt ist. Man kann bei Verwendung gleicher Gelatinemenge und gleich weiter Reagenzgläser auch eine quantitative Bestimmung der Enzymmenge vornehmen durch einfaches Abmessen der Verflüssigungssäulen. Mit Hilfe von Trypsinlösungen von bestimmter Konzentration läßt sich vorher die Gelatine gewissermaßen eichen und die peptische Bakterienenzymwirkung mit der des Trypsin zahlenmäßig vergleichen.

Schouten[130] hat folgende Methode der Untersuchung von Kulturflüssigkeiten auf Enzym angegeben: Man nimmt mit Thymol gesättigtes Wasser und fügt 7,5 Proz. Gelatine hinzu, darauf so viel feinzerriebenen Zinnober, daß die Flüssigkeit intensiv rot wird. Diese Mischung wird zu je 5 ccm in Reagenzröhrchen gegeben, die Röhrchen in ein Wasserbad von 40 Grad gebracht, darauf 10 Sekunden in schräger Lage abgekühlt und senkrecht hingestellt. Die dickflüssige Gelatine haftet alsdann zum Teil in dünner Schicht an der Wandung, zum größten Teil sinkt sie nach unten. Die an der Wandung haftende Schicht stellt infolge ihrer geringen Dicke einen guten Indikator für die Beobachtung der Enzymreaktion dar, deren Resultat sehr viel schneller beobachtet wird, als bei der Fermischen Methode.

Hankin & Wesbrook[59] wiesen die Peptonbildung auf chemischem Weg durch die Biuretreaktion (Kupfersulfat und Kalilauge) nach.

Kalischer untersuchte die Abbauprodukte des Kaseïns, erzeugt durch peptonisierendes Bakterienferment nach den üblichen chemischen Methoden.

Eijkman[41] verwandte zum Nachweis des peptischen Enzyms kaseïnhaltige Nährböden, die er durch Mischen von 1 Teil sterilisierter Magermilch und 1 Teil Agar bereitete.

Lauber[85] empfiehlt für die Prüfung auf peptisches Ferment die Heranziehung des Löfflerserum-Schrägagarröhrchens. De Waele & Vandervelde[154 u. 155] bestimmen quantitativ die Fermente durch Messen der unverändert gebliebenen Gelatine bzw. Kaseins in bestimmten Zeitintervallen. Die Antiproteolase wurde von de Waele durch Versetzen gleicher Mengen Trypsins mit vorher verschieden stark erwärmten (55—100°) Kulturen gemessen.

Zum Nachweis diastatischer Enzyme benutzt man stärkehaltige Nährsubstrate (Stärkekleister), in denen der gebildete Zucker auf chemischem Wege nachgewiesen wird. Ebenso kann man nach dem Vorgang von Kabazany[68] den Zucker quantitativ durch Titrierung bestimmen. Went[159] benutzte zur Demonstration der Diastase Stärkeagarplatten und wies die Zuckerbildung durch Uebergießen einer verdünnten Jodlösung nach. An den Stellen der Platte, an denen durch Umsetzung aus der Stärke Zucker gebildet worden war, blieb die Platte farblos, im übrigen färbte sie sich blau.

Der Nachweis von Labfermenten geschieht in der üblichen Weise mit Hilfe steriler Milch.

Der Nachweis der invertierenden Fermente kann in zuckerhaltigen Lösungen mittels des Polarisationsapparates erbracht werden oder nach Fermi & Montesano[46] durch die Traubenzuckerprobe mit Hilfe des Nylanderschen oder Rubner-Penzoldtschen Reagenzes.

Das Harnferment (die Urase), das eine hydrolytische Spaltung gewisser Amidverbindungen des Harns bewirkt, wird durch den chemischen Nachweis der betreffenden Substanzen erkannt.

Die Spaltung der Fette ist noch nicht sicher als rein enzymatisch erwiesen.

L. Methoden der künstlichen Virulenzänderung.

Die Bestimmung der Virulenz geschieht an geeigneten Versuchstieren unter Dosierung des Virus in der oben geschilderten Weise. Man hat jedoch verschiedentlich auch versucht, eine genaue Virulenzbestimmung mit Umgehung des Tierversuchs zu ermöglichen. Beyer[12] hat eine Methode der Virulenzbestimmung auf die Tatsache begründet, daß sich um ein Stück metallischen Silbers, das man auf eine geimpfte Agarplatte legt, in gewissem Umkreis keine Kolonien entwickeln, weil Stoffwechselprodukte der Mikroben mit dem Silber keimtötend wirken. Je geringer die Virulenz, desto weiter von der Silberplatte entfernt beginnt das Wachstum. Hochvirulente Kulturen vermögen bis nahe an die Silberplatte heranzuwachsen. Die gleiche Methode wurde auch von Syngaewskij[148] angewandt. Marx & Woithe[93] glauben die Virulenz bei sporenlosen Bakterien aus dem Grad der Ausbildung der Babes-Ernstschen Körperchen bestimmen zu können.

Schottmüller[129] glaubte in der Hämolyse ein Mittel zu besitzen, pathogene und apathogene Streptokokken unterscheiden zu können. W. Koch[76] wollte das Verfahren auch für Staphylokokken heranziehen und empfahl hierfür besonders die Kaninchenblutagarplatte.

Gegen diese Methode der Virulenzbestimmung der Streptokokken sprechen sich u. a. Freymuth[48], Lüdke & Polano[91], Bondy[17], Sachs[124–126] aus; auch Fromme & Heynemann[51] warnen vor Ueberschätzung der Methode.

Fromme[50] benutzt zur Differenzierung virulenter und avirulenter Streptokokken eine 2-proz. Lecithinbouillon, der er Streptokokkenbouillonkulturen in bestimmter Menge zusetzt. Das Wachstum der virulenten Stämme soll mehr gehemmt werden als das der avirulenten. — Auch der Wert dieser Methode wird von vielen Autoren negiert, u. a. von Sachs (l. c.), Traugott[151], Koch[77].

Am geeignetsten erscheint noch das von J. Bürgers[24] für die Virulenzbestimmung von Streptokokken angegebene Verfahren: Mit einer 1,5-proz. Natrium-citricum-Lösung wird eine Emulsion der betreffenden Bakterien hergestellt, diese zu gleichen Teilen nach der Wrightschen Methode der Opsininbestimmung (siehe den betr. Abschnitt) mit normalem Menschenblut gemischt, 10 Minuten bei 37° gehalten, ausgestrichen und gefärbt. — Von 100 Leukocyten bestimmt man die Zahl derer, die nicht „gefressen" haben: „Virulenzzahl". Diese liegt bei avirulenten Streptokokken zwischen 0 und 30, bei virulenten zwischen 50 und 100.

Zur Konservierung der Virulenz züchtet Walker[153] in Bouillon, die mit dem homologen Antiserum versetzt ist. Shaw[136], Wechsberg[156] und Hamburger[58] verfahren ähnlich. Symmers[147] versetzt die mit Aqua dest. abgeschwemmte Agarkultur mit wenig Immunserum, läßt 24 Stunden bebrüten, hiervon wieder Agarkulturen anlegen, die wiederum in gleicher Weise behandelt werden.

Czarnecka[32] schlägt zur Konservierung der Lebensfähigkeit und Virulenz der Mikroben vor, das Rückenmark von geimpften und infolge der Infektion verendeten Tieren in einer Flasche mit trockenem Kali caustic. aufzubewahren. Heim[62] trocknet Blut, Eiter etc. an Seidenfäden an.

1. Methoden der Virulenzabschwächung.

Ausgehend von der Tatsache, daß die Virulenz pathogener Bakterien eine sehr variable ist, sind zahlreiche Methoden angegeben worden, um die für die Praxis der Immunisierung so überaus wichtigen, in ihrer Virulenz herabgesetzten Kulturen zu gewinnen. Fast alle diese Methoden arbeiten mit Hilfe von Mitteln, die bei längerer und intensiver Anwendung eine vollständige Abtötung aller Keime zur Folge haben. Ganz allgemein läßt sich sagen, daß die Methoden, die die Abschwächung allmählich herbeiführen, eine dauerhaftere Virulenzverminderung bewirken als jene Methoden, die eine intensive und schnelle Abschwächung verursachen.

Auf das Wesen der Virulenz ist hier nicht weiter einzugehen; es seien nur die Methoden geschildert, die man zur Abschwächung von pathogenen Bakterienkulturen anwendet. (Näheres siehe Kapitel Immunisierungsmethoden.)

a) Durch Züchtung von Bakterien bei Temperaturen, die zwischen der optimalen und der keimtötenden liegen, erreicht man eine Abschwächung der Virulenz. Je weniger dabei die Temperatur sich über die optimale erhebt, desto länger dauert es, bis die Abschwächung erreicht ist. Aber diese ist dann, wie bereits erwähnt, haltbarer und kehrt in den folgenden Generationen nicht leicht wieder

auf die ursprüngliche Höhe zurück. Toussaint[150] erreichte zuerst eine Virulenzabnahme des Milzbrandbacillus durch 10 Minuten langes Erhitzen des keimhaltigen Blutes auf 45°. Chauveau[34] erhitzte Milzbrandbakterien 1 bis 3 Stunden auf 47°, um sie abzuschwächen. Auch die Sporen seiner avirulenten Bacillen waren weniger widerstandsfähig wie normale. Pasteur, Chamberland & Roux[107] erhielten eine dauerhaftere Abschwächung durch wochenlange Züchtung bei 42—43°. Auf die gleiche Weise haben auch Koch, Gaffky & Löffler[78] Milzbrand mitigiert. Bei dieser Form der Abschwächung durch erhöhte Temperaturen beeinflussen schon Bruchteile eines Grades deutlich die Wirkung. Je höher die Temperatur, um so kürzere Zeit bedarf es ihrer Einwirkung. Die Erzielung einer völligen Avirulenz dauert bei Milzbrand bei 43° 9 Tage, bei 42,6° 24 Tage und bei 42° 43 Tage. Bei der Temperatur von 42,6° gezüchtet, ist der Milzbrand noch nach 6 Tagen für Schafe, nach 10 Tagen für Kaninchen, nach 12 Tagen noch für Meerschweinchen und nach 20 Tagen noch für Mäuse virulent. Vom 24. Tag ab wird er völlig avirulent. Bei Milzbrandsporen erreichte Geppert[54] durch 2 Minuten lange Einwirkung siedenden Wasserdampfes eine Virulenzverminderung.

b) Gleichzeitig durch erhöhte Temperatur und durch erhöhten Druck haben Wossnessensky[165] sowie Chauveau[35], Bakterien abgeschwächt. d'Arsonval[2] wandte mittels flüssiger Kohlensäure einen Druck von 45 Atmosphären bei einer Temperatur von 40° zur Mitigation des Milzbrandes an.

c) Unbeständiger als durch Temperaturen ist die Virulenzabnahme, die die Bakterien durch das Tageslicht und speziell durch die Sonnenstrahlen erfahren. Die Abschwächung durch diesen Faktor wurde zuerst von Arloing[1] studiert. Sporenmaterial von Milzbrand verhält sich, wie Kruse[82] gezeigt hat, dieser Methode gegenüber passiv.

d) Pasteur[106] hat zuerst bei seinen Schutzimpfungen gegen Tollwut den abschwächenden Einfluß erprobt, den die Austrocknung des Virus zur Folge hat. Er brachte ein Stückchen des Rückenmarks oder der Medulla oblongata der an Hundswut verendeten Tiere 14 Tage lang in Gefäße, deren Luft durch Kalinitrat trocken gehalten wurde. Nach Roux kann man Konservierung eines bestimmten Virulenzgrades des Rückenmarks dadurch erreichen, daß man die Stücke in 30-proz. Glyzerin einlegt. Kruse & Pansini[83] machen den berechtigten Einwand, daß bei den Versuchen Pasteurs die beim Trocknen erfolgte Keimverminderung die Virulenzabnahme möglicherweise vorgetäuscht habe. Eine sichere Abschwächung durch Austrocknung haben diese Autoren beim Pneumococcus erreicht.

e) Eine wichtige Rolle hat Pasteur[106] dem Sauerstoff für die Abschwächung zugeschrieben. Bei Kulturen, die er unter Luftabschluß hielt, blieb die Virulenz und Lebensfähigkeit der Keime viel länger erhalten als bei solchen, zu denen die Luft ungehinderten Zutritt hatte. Buchner sah bald eine Abschwächung der Kulturen eintreten, wenn er Milzbrand in Flüssigkeiten züchtete, die in einem Schüttelapparat stets mit Luft durchmischt wurden. Pasteur aber hat bei seinen Kulturen nicht berücksichtigt, daß neben der Luft auch die Stoffwechselprodukte der Bakterien in älteren Kulturen an und für sich eine Abschwächung bewirken, und Buchner hat nicht

in Betracht gezogen, daß eine länger dauernde Erschütterung allein schon eine Abschwächung der Bakterien bedingt.

Bei Luftabfluß kommt es nur zu einer Spaltung des Nährbodens, bei gleichzeitigem Sauerstoffzutritt aber auch noch zu einer Oxydation, und auf die dadurch bedingte schnellere Erschöpfung des Nährbodens ist es mit zurückzuführen, daß Kulturen bei Luftzutritt früher ihre Virulenz verlieren.

f) Neben der Erschöpfung des Nährbodens kommt der Einfluß der von Bakterien gebildeten Stoffwechselprodukte in Betracht. Es genügt also in vielen Fällen, eine Kultur nur in größeren Zeitintervallen auf künstliche Nährböden überzuimpfen und vor allen Dingen, sie nicht durch den Tierkörper zu schicken, um ihren Virulenzgrad herabzumindern.

g) Noch vollkommener erreicht man diesen Zweck durch die Züchtung, wenn man Nährböden mit Zusätzen benutzt, die erfahrungsgemäß die Virulenz herabmindern. Es braucht dabei keineswegs gleichzeitig mit der Virulenzabnahme eine Verminderung der Wachstumsenergie verbunden zu sein. Häufig ist im Gegenteil ein üppigeres Wachstum mit einer Abnahme der Virulenz verknüpft, z. B. verliert der Tuberkelbacillus durch Züchtung auf glyzerinhaltigen Nährböden, auf denen er sehr gut wächst, leicht seine Infektiosität.

Nach Levy[88] werden Tuberkelbacillen bei einer Temperatur von 37° in einer 80-proz. Glyzerinlösung oder in konzentrierter Zuckerlösung nach 24 Stunden merklich abgeschwächt, in Glyzerin nach 48 Stunden, in einer 25-proz. Zuckerlösung nach 4—5 Tagen unschädlich gemacht.

Noch sicherer kommt man zum Ziel, wenn man zu den Nährböden Zusätze von antiseptischen Stoffen macht in Mengenverhältnissen, die das Wachstum nicht aufheben.

Chamberland & Roux[33] gaben zu diesem Zwecke zu neutralisierter Kalbsbouillon, die mit Milzbrandbacillen geimpft war, geringe Mengen von Karbolsäure, Kaliumbichromat oder Schwefelsäure. Bei Zusatz von Karbolsäure 1:600 waren die Bakterien nach 12 Tagen nur für Meerschweinchen und Kaninchen infektiös, nach 29 Tagen vollständig avirulent. 1:8000 hemmte die Sporenbildung, die erst bei 1:1200 wieder eintrat. Kaliumbichromat schwächte den Milzbrand in einer Konzentration von 0,05 Proz. Durch Kombination dieser Methode mit der Pasteurschen Erhitzungsmethode gelang den beiden genannten Autoren die weitere Abschwächung von Milzbrandbacillen, die vorher bei 42—43° gezüchtet waren, bei weit stärkerer Verdünnung der Antiseptica. Die Virulenzvernichtung von Milzbrandsporenmaterial erreichten Chamberland & Roux durch 2-proz. Schwefelsäure, Geppert durch 0,1—0,2-proz. Chlorlösung. Jodtrichlorid wurde von Behring & Kitasato[7] benutzt, um den Diphtheriebacillus abzuschwächen.

Kolle & Strong[81] erhielten eine Abschwächung der Virulenz von Pestbacillen durch Züchtung bei 41—43° in Bouillon, der Alkohol zugesetzt ist.

h) Aber selbst bei Verwendung von Nährböden, die in ihrer Zusammensetzung den Substraten am meisten entsprechen, auf denen pathogene Bakterien ihr natürliches Fortkommen finden, tritt selbst bei häufiger Ueberimpfung, durch die eine Erschöpfung des Nähr-

bodens oder die Bildung schädlicher Stoffwechselprodukte ausgeschlossen ist, doch mit der Zeit eine Virulenzabnahme ein. Es ist das am einfachsten durch eine allmähliche Anpassung der ursprünglich parasitisch veranlagten Bakterien an die saprophytische Lebensweise zu erklären. So genügt z. B. für den Diphtheriebacillus oder für Rotz eine mehrere Generationen dauernde künstliche Züchtung ohne Tierpassage auch auf den günstigsten Nährböden und bei häufiger Ueberimpfung, um die Kulturen ihrer krankheitserregenden Fähigkeit zu berauben.

k) Auch die Tierpassage selbst ist unter Umständen ein Mittel, um die Virulenz zu vermindern, falls man Tiere nimmt, in denen die Bakterien keine günstigen Lebensbedingungen finden.

Um den Schweinerotlaufbacillus abzuschwächen, wandte Pasteur[108] die Passage durch Kaninchen an. Kitt[72], sowie Smirnow[141] konnten allerdings die Resultate Pasteurs nicht bestätigen; andere Beispiele für Abschwächung durch Tierpassage sind die Abschwächung des Lyssavirus bei der Passage durch Affen (Pasteur), des Milzbrandes bei der Passage durch den Hammel (Chauveau[36]), des Tuberkelbacillus im Peritoneum des Huhns (Gramatschikoff[57]).

2. Methoden der Virulenzsteigerung.

Nach der Aufzählung der Methoden der Abschwächung ergeben sich die Methoden für die Steigerung der Virulenz zum Teil von selbst.

a) Wie die Züchtung auf ungünstigen Nährböden die Virulenz herabsetzt, so wird die Fortpflanzung auf Nährböden, die in ihrer Zusammensetzung den tierischen Säften nahe stehen, die Virulenz wenigstens für gewisse Zeit unter Umständen steigern; so ist ein Zusatz von Blut zum Nährboden imstande, die Virulenz vieler Bakterienarten zu erhöhen, wie das z. B. Chauveau für den Milzbrand nachgewiesen hat. Nach Blachstein[14] wird die Virulenz durch Gegenwart von Kaliumnitrat, Natriumphosphat und anorganischer Eisensalze im Nährboden erhöht.

b) Sicherer als durch Züchtung auf geeigneten Nährböden erreicht man eine Virulenzerhöhung durch Tierpassage. Man nimmt zweckmäßig bei der ersten Impfung eine große Menge der Kultur und benutzt junge Tiere. Das bakterienhaltige Material der eingegangenen Tiere überträgt man, falls die Keime sich gut entwickelt haben, direkt von Tier zu Tier, bis ein gewünschter Grad der Virulenz erreicht ist. Durch Passage von Tier zu Tier gelang es auf diese Weise Czaplewski[37], Tauben für Milzbrand, für den diese Tiere sonst unempfindlich sind, virulent zu machen. Für Cholera und Typhus erreicht man leicht eine hohe Virulenz dadurch, daß man den Bauchhöhleninhalt intraperitoneal geimpfter und eingegangener Meerschweinchen auf andere Tiere überimpft, bei der Pest nach Kolle & Martini[80] durch Uebertragung des Lungensaftes an Pest eingegangener Tiere auf andere. Uhlenhuth & Mulzer[91] erzielten eine Virulenzsteigerung des syphilitischen Virus durch fortgesetzte Tierpassage beim Kaninchen (für das Kaninchen).

Da man jedoch auf diese Weise keinen bestimmten Anhaltspunkt über die Menge des einverleibten Virus hat, so ist es, da wo es angeht, zweckmäßiger, aus den einzelnen eingegangenen Tieren Reinkulturen anzulegen und von diesen weiter zu impfen.

Die durch Tierpassage zu erreichende Virulenzsteigerung ist keine unbegrenzte. Kulturen mit der höchst erreichbaren Virulenz bezeichnet Pasteur als „virus fixe".

Will man die Passage mit Hilfe weniger empfänglicher Tiere vornehmen, so muß man die Widerstandsfähigkeit der Versuchstiere durch äußere Einflüsse zu schwächen suchen.

c) Die Virulenz bei der Tierpassage kann weiter gesteigert werden durch gleichzeitige Mitverimpfung anderer, auch unter Umständen gar nicht krankheiterregender Bakterienarten, ja selbst durch gleichzeitige Einverleibung abgetöteter Keime oder steriler Stoffwechselprodukte von Bakterien.

Die Virulenz des Pneumococcus kann man z. B. durch gleichzeitige Verimpfung von Milzbrand steigern. In gleicher Weise wirken Streptokokken nach Roux & Yersin[120] auf die Virulenz des Diphtheriebacillus. Durch ganz unschuldige Saprophyten konnte Novy[103] die Infektiosität für Tetanus und malignes Oedem erhöhen. Durch gleichzeitige Injektion abgetöteter Colikulturen oder sterilisierter Faulflüssigkeiten läßt sich die Empfänglichkeit für Typhus steigern und anderes mehr. (Ueber die entsprechende Wirkung der Aggressine Bails siehe die betreffenden Kapitel.)

Literatur zum VI. Kapitel.

1. Arloing, Compt. rend., T. 101, 1885.
2. d'Arsonval, ref. Centralbl. f. Bakt., Bd. 9, 1891.
3. Baumann, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 25.
4. Behring, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 5 u. 7, 1889.
5. — ebd., Bd. 6, 1889.
6. — ebd., Bd. 7, 1889.
7. Behring & Kitasato, Deutsche med. Wochenschr., 1890.
8. Beijerinck, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 9, 1891.
9. — ebd., Bd. 14, 1893.
10. — ebd., II. Abt., Bd. 6, 1900.
11. Berghaus, Hyg. Rundsch., Bd. 16, 1906.
12. Beyer, Allgem. med. Centralztg., 1898.
13. Bitter, Arch. f. Hyg., Bd. 5, 1886.
14. Blachstein, Berl. klin. Wochenschr., 1894.
15. Bleisch, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 14, 1893.
16. Boehme, A., Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, Heft 1, 1906.
17. Bondy, Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol., Bd. 29, Heft 6.
18. Botkin, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 11, 1892.
19. Buard, G., C. r. soc. biol., T. 65, 158, 1908.
20. Buchner, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 4, 1888.
21. — Arch. f. Hyg., Bd. 3, 1885.
22. Buchner, Longard & Riedlin, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 2, 1887.
23. Bujwid, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 2, 1887.
24. Bürgers, Centralbl. f. Gynäkol., Bd. 18, 1910.
25. Burri & Düggeli, Centralbl. f. Bakt., Bd. 49, Heft 2, 1909.
26. Cahen, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 2, 1887.
27. Carapelle, Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, Heft 5, 1908.
28. Carnot, P. & Garnier, M., C. r. de la soc. de biol., p. 748 u. 860, 1909.
29. Cesa-Bianchi, Il lavore, 1911, Nr. 10.
30. Cohn, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, 1876.
31. — Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 12, 1892.
32. Csarnecka, L., ebd., Bd. 38, Heft 2, 1905.
33. Chamberland & Roux, Compt. rend. de l'acad., T. 96, 1883.
34. Chauveau, ebd., T. 96, 1883.
35. — ebd., T. 98.
36. Chauveau, Compt. rend. de l'acad., T. 108.
36a. Conradi & Kurpjuweit, Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 37.
37. Czaplewski, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 12, 1892.

38. Dunbar, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 12, 1892.
39. Dunham, ebd., Bd. 2, 1887.
40. Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus, Berlin 1885.
41. Eijkman, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 29, 1901.
42. Emmerich, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 38.
43. Engelmann, Botanische Zeitung, 1881, 1882, 1888.
44. Escallon, J. & Sigre, A., C. r. soc. biol., T. 65, 507, 1908.
45. Fermi, Arch. f. Hyg., Bd. 10, 1890.
46. Fermi & Montesano, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 1, 1895.
47. Frégonneau, Karl, Centralbl. f. Bakt., Bd. 49, Nr. 2, 1909.
48. Freymuth, Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol., Bd. 61, Heft 3, 1907.
49. Fromme, Inaug.-Diss., Marburg 1891.
50. — Zeitschr. f. Gynäkol., 1909, Nr. 35.
51. Fromme & Heynemann, Berl. klin. Wochenschr., 1908, Nr. 19.
52. Fulton, S., John & Wm. Royal Stokes, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 1, 1907.
53. Gabritschewski, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 35, 1900.
54. Geppert, Berl. klin. Wochenschr., 1890.
55. Gorini, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 13, 1893.
56. Gosio, B., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 51, Heft 1, 1905.
57. Gramatschikoff, Centralbl. f. allg. Pathol., Bd. 2, 1891.
58. Hamrurger, Wien. klin. Wochenschr., 1903, Nr. 4.
59. Hankin & Wesbrook, Annal. de l'inst. Past., T. 6, 1892.
60. Hanna, Journ. pathol. and bakteriol., Vol. 5.
61. Hehewerth, Arch. f. Hyg., Bd. 39, 1901.
62. Heim, L., Zeitschr. f. Hyg., u. Inf., Bd. 50, Heft 1, 1905.
63. Hesse, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 15, 1893.
64. Higgins, Centralbl. f. Bakt., Bd. 29, 1901 u. Bd. 37, Heft 2, 1904.
65. Hilgermann, Klin. Jahrb., Bd. 19.
66. Jacobitz, ebd., I. Abt., Bd. 30, 1901.
67. Jacobsen, ebd., Bd. 57, Heft 1, 1911.
68. Kabazany, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 13, 1893.
69. Kalischer, Arch. f. Hyg., Bd. 39, 1900.
70. Kaufmann, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 10, 1891.
71. Kitasato & Weyl, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 8, 1890.
72. Kitt, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 2, 1887.
73. Klett, ebd., Bd. 27, 1900.
74. Koch, A., ebd., Bd. 13, 1893.
75. Koch, R., Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 1.
76. Koch, W., 37. Versamml. d. Deutschen Gesellsch. f. Chir., 1908.
77. Koch-Greifswald, 82. Versamml. Deutsch. Naturf. u. Aerzte, 1910.
78. Koch, Gaffky, Löffler, Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 2, 1884.
79. Kokubo, Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, Heft 1, 1905.
80. Kolle & Martini, Deutsche med. Wochenschr., 1902.
81. Kolle & Strong, ebd., 1906, Nr. 11.
82. Kruse, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 19, 1895.
83. Kruse & Pansini, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 11, 1892.
84. Lander, Brunton & Macfadyen, Proc. of the roy. soc. London, Bd. 46.
85. Lauber, Centralbl. f. Bakt., Bd. 56, Heft 5/6, 1910.
86. Laurent, Edmund, Das Virulenzproblem d. path. Bakt. Jena, G. Fischer, 1910.
87. Lehmann, Arch. f. Hygiene, Bd. 46, 1903.
88. Levy, Intern. TB.-Kongr., Paris 1905.
89. Liachowetzky, Centralbl. f. Bakt., Bd. 57, Heft 2, 1911.
90. Liebreich, Berl. klin. Wochenschr., 1893.
91. Lüdke & Polano, Münch. med. Wochenschr., 1909, Nr. 1.
92. Marshall, W. E., Journ. of Hyg., Vol. 7.
93. Marx & Woithe, Arb. a. d. chir. Klinik Berlin, Bd. 15, 1901.
94. Michaelis, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 29, 1901.
95. Morelli, ebd., Bd. 50, Heft 3, 1909.
96. Morris, Arch. f. Hyg., Bd. 30, 1897.
97. Müller, Max, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 20, 1895.
98. Müller, Fr., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 26, Nr. 2/3, 25, 1899.
99. Mulzer, Berl. med. Gesellsch., 8. Dez. 1909.
100. Neisser, M. & Wechsberg, Münch. med. Wochenschr., 1900.
101. Noeggerath, Fortschr. d. Med., Bd. 6, 1888.
102. Nonotte, M. & Demanche, R., C. r. soc. biol., T. 64, 494, 1908; vgl. Bull. Inst. Pasteur, T. 6, 578, 1908.

103. Novy, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 17, 1894.
104. Pasteur, Etudes sur la bière, 1876.
105. Pasteur, Compt. rend. de l'acad., T. 90, 1880.
106. — ebd., T. 91, 1880.
107. Pasteur, Chamberland, Roux, ebd., T. 92, 1881.
108. Pasteur, ebd., T. 97, 1883.
109. Peckham, Journ. of exper. med., Vol. 2, 1897.
110. Pelz, E., Centralbl. f. Bakt., Bd. 57, Heft 1, 1911.
111. Perty, Zur Kenntnis klinischer Lebensformen, 1852.
112. Petri, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 5, 1889.
113. Petri & Maassen, Mitteil. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 8
114. Petruschky, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 6, 1899.
115. Pöhl, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 1886.
116. Poppe, Kurt, Centralbl. f. Bakt., Bd. 55, Heft 6, 1910.
117. Proskauer & Voges, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 28, 1898.
118. Rotberger, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 24, 1898.
119. v. Rozsahegi, ebd., Bd. 2, 1887.
120. Roux & Yersin, Ann. Past., 1888.
121. Rubner, Arch. f. Hyg., Bd. 16, 1892; Bd. 19, 1893.
122. — ebd., Bd. 49, 1904.
123. Rywosch, B. & M., Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, Heft 4, 1907.
124. Sachs, Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol., Bd. 31, Heft 6.
125. Sachs, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 63, Heft 3, 1909.
126. — Centralbl. f. Gynäkol., 1910, Nr. 18.
127. Salkowski, Virch. Arch., Bd. 10.
128. Scheffler, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 28, 1900.
129. Schottmüller, Münch. med. Wochensehr., 1903, Nr. 20.
130. Schouten, S. L., Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 18, Nr. 1—3, 1907.
131. Schultze, W., Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 24.
132. Schultze, H. W., Centralbl. f. Bakt., Bd. 56, Heft 5/6, 1910
133. Seelig, Virch. Arch., Bd. 146, 1896.
134. Seiffert, G., Münch. med. Wochenschr., 1907, Nr. 46.
135. Selter, Centralbl. f. Bakt.. Bd. 51, Heft 5, 1909.
136. Shaw, Brit. med. Journ., 1903 Mai.
137. Slupski, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 30, 1901.
138. Smith, ebd., Bd. 19, 1896.
139. Smith, ebd., Bd. 7, 1890.
140. Smith, Th., Journ. of exper. med., Bd. 2, 1897.
141. Smirnow, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 4, 1889.
142. Sommaruga, ebd., Bd. 12, 1892.
143. Spina, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 2, 1887.
144. Steensma, ebd., Bd. 41, Heft 2, 1906.
145. Stiegel, ebd., Bd. 45, Heft 4, 1908.
146. Süpfle, ebd., Bd. 53, Heft 4, 1910.
147. Symmers, ebd., Bd. 37, Heft 1, 1904.
148. Syngaewskji, Russ. Arch. f. Pathol., Bd. 8; ref. Baumgartens Jahresber., 1899.
149. Telle & Huber, E., Centralbl. f. Bakt., Bd. 58, Heft 1.
150. Toussaint, Compt. rend. de l'acad., T. 91, 1880.
151. Traugott, Wiss. Vereinig. am städt. Krankenh. zu Frankfurt, 20. April 1910.
152. Uhlenhuth, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 2, 1909.
153. Walker, Brit. med. Journ. Rit., 1902.
154. de Waele & Vandervelde, Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, Heft 4, 1905.
155. de Waele, Henri, Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, Heft 1, 1909.
156. Wechsberg, Wien. klin. Wochensehr., 1903, Nr. 5.
157. Weidanz, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 46, Heft 6, 1908.
158. Weissenberg, H., ebd., II. Abt., Bd. 8, Nr. 12, 1902.
159. Went, Sitz.-Ber. d. Königl. Akad. d. Wissensch. zu Amsterdam, Februar 1910.
160. Wieck, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 40.
161. Winterberg, Zeitschr. f. Hyg., Nr. 29, 1898.
162. Wortmann, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 6, 1881.
163. Wolff, A., Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 27, 1900.
164. Wolff-Eisner, ebd., Bd. 49, Heft 5, 1909.
165. Wossnessensky, Compt. rend. de l'acad., Bd. 98, 1884.

VII. Kapitel.

Hilfsapparate zu bakteriologischen Untersuchungen.

1. Bakterienfilter.

Zur Untersuchung der in flüssigen Bakterienkulturen gebildeten Stoffwechselprodukte und zur Untersuchung der Bakterienleiber selbst ist es nötig, korpuskuläre Elemente und gelöste Bestandteile voneinander zu trennen. Dies geschieht mit Hilfe von keimdichten Bakterienfiltern, deren Poren so klein sind, daß sie Mikroorganismen den Durchtritt verwehren. Man erhält dann auf dem Filter zurückbleibend die Bakterienmasse und im sterilen Filtrat die Stoffwechselprodukte. Von letzteren werden allerdings, und das ist der Nachteil der Filtration, gewisse Mengen im Filter zurückgehalten. Namentlich gilt dies nach Sirotinin[14] für die ersten durch das Filter gehenden Flüssigkeitsmengen. Arloing[1] fand, daß auch bei Ueberdruck von 3 Atmosphären ein Chamberlandsches Filter im neuen Zustand bedeutend größere Mengen der gelösten Substanzen zurückhält, als nach längerer Benutzung. Quantitative Bestimmung der adsorbierten Eiweißmengen hat W. Rosenthal[13a] ausgeführt.

Die Bakterienfilter bestehen aus zwei Hauptteilen; erstens dem eigentlichen Filterapparat und zweitens einem Rezipienten für die filtrierte Flüssigkeit. Die Filtration geschieht stets unter Druckdifferenzen, indem entweder die Flüssigkeit unter erhöhtem Druck durch das Filter durchgepreßt wird oder in dem Gefäß, in das die filtrierte Flüssigkeit hineinfließt, eine Luftverdünnung erzeugt wird.

Das erste Bakterienfilter aus gebranntem Ton wurde von Tiegel (1871) angegeben. Pasteur & Joubert[11] verwandten Gipsfilter, ebenso Miquel & Bennoist. Später benutzten Pasteur & Chamberland[4] Filter aus Biskuitporzellan. Nordmeyer[10] empfohl die von Berkefeld fabrizierten Filter aus Infusorienerde. Sie haben gegenüber den Porzellanfiltern den Vorzug, daß sie eine schnellere Filtration ermöglichen. Die Oberfläche läßt sich sehr leicht mittels eines Luffawischers von angesetzten Schlickschichten reinigen, was bei dem härteren Porzellan nur schwer möglich ist. Die Berkefeldschen Filter sind dagegen leicht zerbrechlich und werden nach Dachniewsky[5] schneller von den Keimen durchwachsen als die Porzellanfilter. Sehr gebräuchlich besonders für die Filtration größerer Flüssigkeitsmengen sind Filter aus gebranntem Koalin von Pukall.

Das Filtermaterial ist im allgemeinen keineswegs homogen, sondern, wie sich aus der Untersuchung von Dünnschliffen aus Filtermaterial durch E. v. Esmarch[5a], W. Rosenthal[13a], P. Schmidt[13b] ergibt, namentlich bei den Berkefeldfiltern von sehr ungleicher Beschaffenheit.

Ueberhaupt gibt es nach W. Rosenthal keine ganz gleichartigen Filter. Für die Brauchbarkeit kommt nach diesem Autor nicht nur die „mittlere Porengröße, entsprechend dem Porenvolumen, sondern auch die Grenzwerte und die relative Verteilung der verschiedenen Porengrößen in Betracht".

Die „wirksame Porengröße“ (W. Rosenthal[13a]) ist der engste Durchmesser, der sich in jedem der außerordentlich vielen vorhandenen Porengänge mindestens an einer Stelle findet. Sie beträgt nach ihm für bakteriendichte Filter $^1/_2$—2 μ, nach P. Schmidt 0,2—0,8 μ.

Weiteres über die Theorie der Filterwirkung siehe die Arbeiten von W. Rosenthal (l. c.), P. Schmidt (l. c.), Bechold[1a], Hofstädter[8a], Szigmondi u. a. (vgl. die Abschnitte über invisible Virusarten).

Nach der Filtration sind die Filter sorgfältig auszuwaschen, bis namentlich bei Filtration von eiweißhaltigen Lösungen alles Eiweiß aus den Filterporen möglichst verdrängt ist. Zur Sterilisation werden sie alsdann in kaltem Wasser angesetzt und entsprechend lang darin gekocht.

Zur Regeneration wiederholt gebrauchter Filter empfiehlt sich vorsichtiges Ausglühen (in einem Verbrennungsofen). Dabei können aber leicht Sprünge entstehen (Prüfung durch Durchpressen von Druckluft unter Wasser), die die Filter unbrauchbar machen. Aber auch abgesehen davon, lassen sich nach Rosenthal die Filter nicht wieder zuverlässig so herstellen, wie sie vor dem Gebrauch waren; es ist also für vergleichende Untersuchungen auch wiederholte Benutzung ein und desselben Filters nur bedingt zulässig.

Fig. 135.

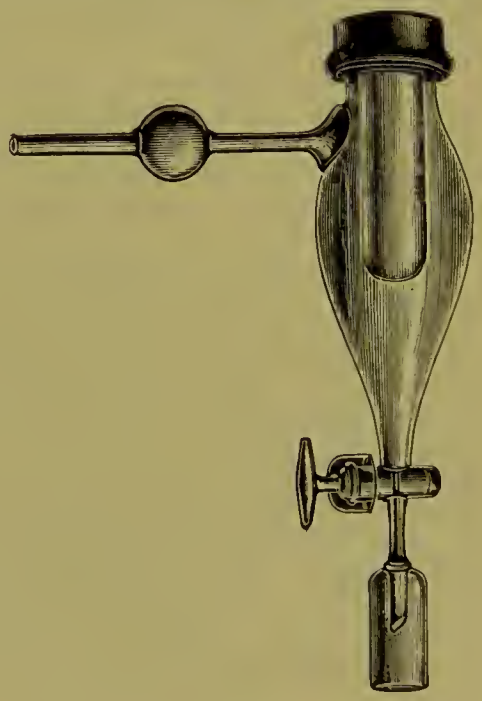


Fig. 136.

Für die Montierung der Filter bestehen verschiedene Methoden, wobei man natürlich Filter aus dem verschiedensten Material benutzen kann. Der Filtrationsapparat von Miquel besteht aus einem Ballon, dessen Hals im unteren Drittel verengt ist. In den über der Verengerung befindlichen Teil des Halses wird die Filtermasse (Gips) eingebracht. Unterhalb der Verengerung befindet sich ein Ansatz, der mit der Luftpumpe in Verbindung gesetzt werden kann. Die mittels eines Trichters auf das Gipsfilter gebrachte Flüssigkeit wird

durch das angefeuchtete Filter hindurch in den Kolben gesaugt. Zur Filtration leicht zersetzlicher Flüssigkeiten hat Miquel eine Eiskühlvorrichtung angegeben.

Bei der gebräuchlichen Anordnung des Chamberlandschen Filterapparates wird mittels einer Luftpumpe die in dem Reservoir befindliche Flüssigkeit von außen durch die Wände der Porzellankerze hindurchgepreßt.

Das Reichelsche Filter (Fig. 135) besteht aus einer Porzellanfilterkerze, die in ein mit zwei Tuben versehenes Gefäß hineinragt und mittels eines Kragens auf dem Flaschenrand ruht. Die Abdichtung erfolgt durch eine Gummikappe, die ein zentrales Loch besitzt, durch das die Kerze beschickt wird. Zum Gebrauch wird der eine Tubus mittels Quetschhahn und Gummischlauch luftdicht geschlossen, der andere mit der Wasserstrahlpumpe in Verbindung gesetzt. Aehnliche Konstruktion besitzt das Filter nach Maassen, dessen Flasche nur einen Tubus zur Luftpumpe besitzt. Am unteren Ende der Flasche befindet sich ein durch Hahn verschließbares Ablaufrohr, das eine sterile Abfüllung der filtrierten Flüssigkeit gestattet (Fig. 136).

Bei dem Filter von Kitasato wird die Kerze, die aus Porzellanmasse besteht, mittels Gummischlauchs in eine Glasbirne eingesetzt und der ganze Apparat auf eine mit Absaugvorrichtung versehene Flasche montiert.

Zur Filtration kleiner Mengen von Flüssigkeit benutzt man die sogenannten Liliputfilterkerzen aus Infusorienerde. Die Kerzen sind auf ein Metallrohr aufgekittet und werden luftdicht in einen oben offenen und unten mit einer für das Ansatzstück passenden Oeffnung versehenen Glaszylinder eingeschraubt (Fig. 137 a, b). Da die gewöhnliche Kittung bei der Sterilisierung mit strömendem Dampf leicht Sprünge erleidet so hat neuerdings v. Wunschheim eine neue Type mit „Inneneinkettung“ und Verschluß der Kittlinie mit Gummiplatten angegeben. Das Filter wird mittels Gummipfropfen auf eine Saugflasche aufgesetzt und die in den Zylinder gegossene Flüssigkeit von außen in die Flasche hineingesogen. Zum Sammeln kleiner Mengen von Filtrat setzt man in die Saugflasche ein Reagenzglas ein, in das das Filtrat aus dem Filter abfließt. Eine ähnliche Zusammensetzung besitzt der Filtrierapparat, bei dem eine Chamberlandkerze mittels Gummistopfens in einem Glaszylinder eingesetzt ist. Durch die Bohrung geht das Mundstück der Kerze und mündet mittels eines Schlauches in die Saugflasche (Fig. 137d).

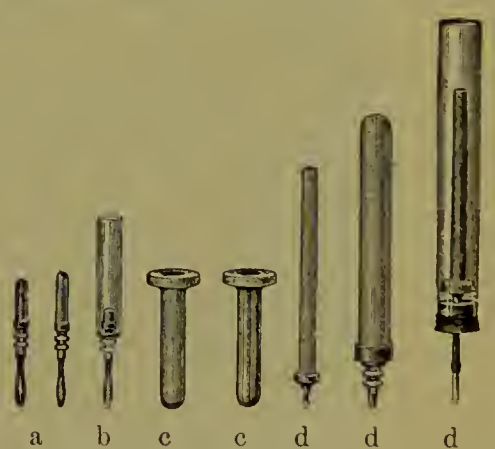


Fig. 137.

Für kleine Mengen sind auch das Filter von Silberschmidt (Fig. 137c), das in seiner Konstruktion dem von Maassen entspricht, aber sowohl bezüglich der Kerze als auch bezüglich der Flasche von erheblich kleinerem Ausmaß ist.

Um Filtermaterial von gleichmäßigerer Beschaffenheit, als es die gewöhnlichen Kerzen liefern, zu erhalten, hat W. Rosenthal[13] aus dem gewöhnlichen Filtermaterial Scheiben anfertigen lassen, die in einer „Filterbüchse" aus Metall eingelegt werden, durch welche das zu filtrierende Material hindurchgesaugt wird.

Der Apparat (Fig. 138a) besteht aus einer Luftpumpe (*P*), die über einer Windbüchse (*Wb*) und ein Manometer (*M*) mit der stählernen Filterbüchse (*Fb*) verbunden ist.

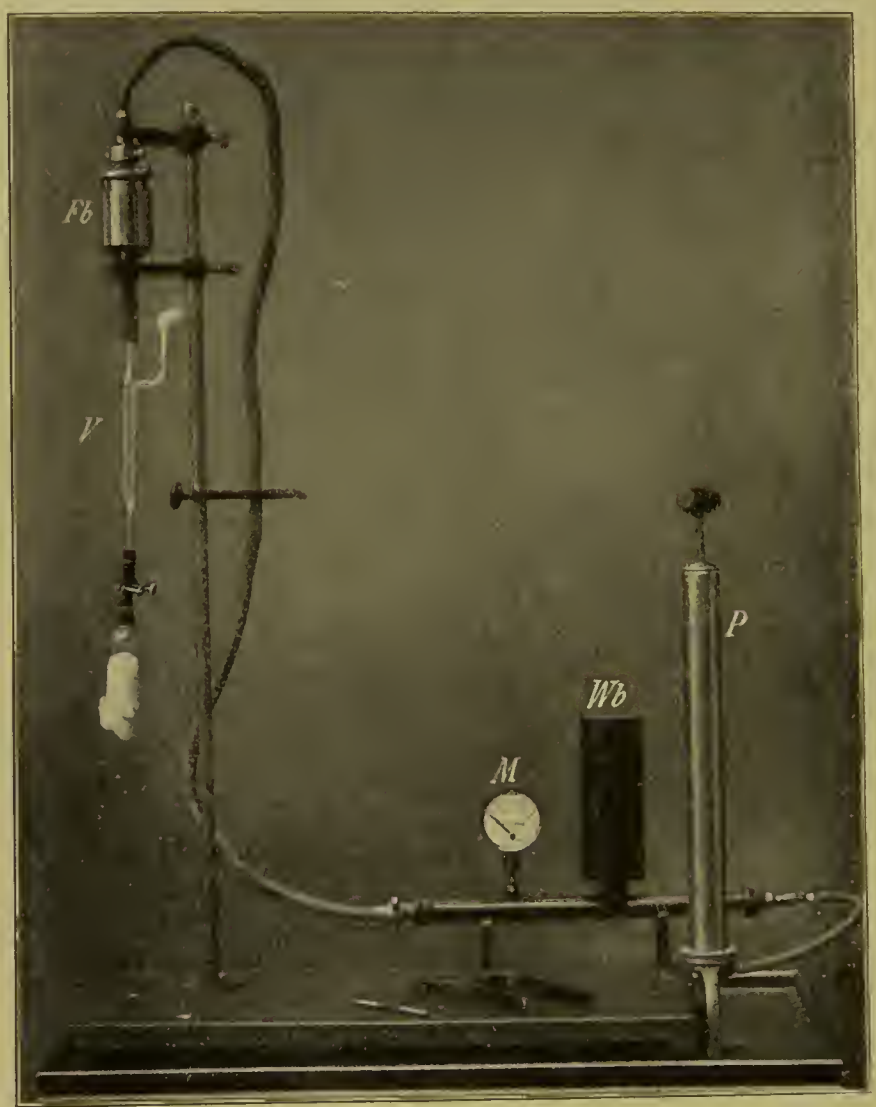


Fig. 138a.

Diese Filterbüchse (Fig. 138b) trägt im Boden die Siebplatte (*S*), auf welche die eigentliche Filterplatte (*Fp*) zu ruhen kommt. Mittels eines Gummirings (*Gr*) erfolgt die völlige Abdichtung. Mit der Filterbüchse ist eine gläserne Vorlage (Fig. 138a, *V*) verbunden, die mit einer Abfüllvorrichtung versehen ist.

Bei dem Pukallschen Tonfilter (Fig. 139) wird die Flüssigkeit von außen nach innen gesaugt. Man setzt die Tonzelle *F* in ein Becherglas *B*, das die zu filtrierende Flüssigkeit enthält. In dem

Tubus T befindet sich ein Gummipfropfen G, durch dessen zentrale Bohrung ein zweimal rechtwinklig gebogenes Rohr R zur Saugflasche S übergeht, die ihrerseits durch das Rohr a mit einer eingeschalteten Wulffschen Flasche und der Luftpumpe verbunden ist.

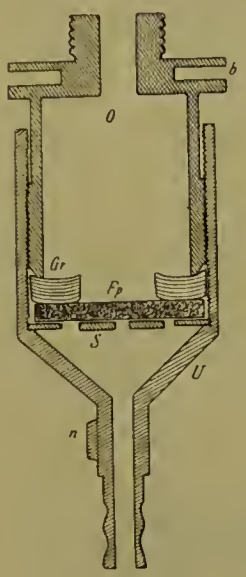


Fig. 138b.

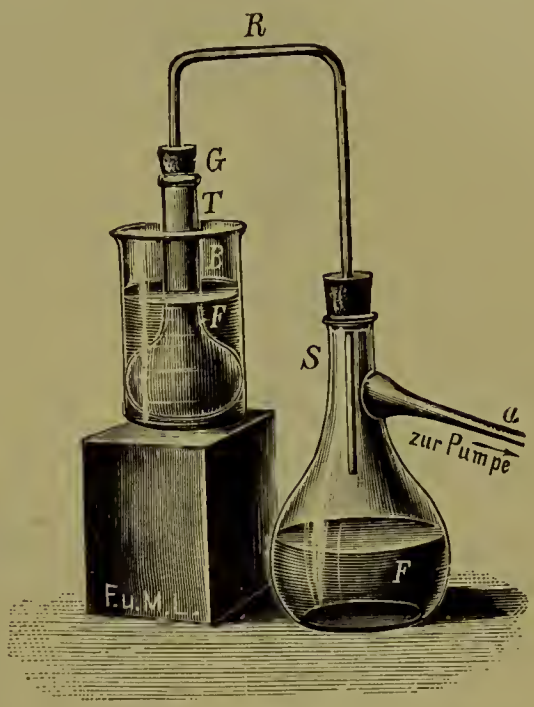


Fig. 139.

Giemsa & Prowazek[6] überzogen die Pukallfilter zur Filtration des Hühnerpestvirus an der äußeren Fläche mit 3-proz. Agar, Celloidin oder Gelatine. Sie empfehlen ferner die Liliputkerzen in ihrem größten Teil mit Paraffin zu imprägnieren und bloß ein kleines terminales Territorium für die Filtration durch die Gallerte zu verwenden. Die kleine terminale Schicht läßt sich dann wie ein Deckgläschen ablösen und nach verschiedenen Methoden zur Färbung benutzen.

Um sicher eine Entnahme der filtrierten Flüssigkeit ohne Verunreinigung zu erlangen, benutzen Pawlowsky & Gladin[12] den folgenden Apparat: In einem Glasgefäß sitzt ein Gummipfropfen mit drei Oeffnungen. Durch die eine Oeffnung ragt eine Kerze in die Flasche hinein, durch die andere geht ein kurzes Glasrohr, das mit einer Wulffschen Flasche verbunden ist, die ihrerseits mit dem Aspirator in Verbindung steht. Durch die dritte Bohrung geht ein Glasrohr bis auf den Boden des Gefäßes; dieses Röhrchen ist nach außen mittels Gummischlauch mit einem zugespitzten Glasröhrchen verbunden. Auf diesem Glasröhrchen steckt nochmals ein kurzer Gummischlauch. Die Kerze ist durch einen Schlauch mit dem Kulturgefäß, das einen seitlichen Stutzen hat, verbunden. Der ganze Apparat wird im Dampf sterilisiert. Dann wird die Verbindung mit dem Aspirator hergestellt und die Flüssigkeit in die Kerze eingelassen. Nach beendigter Filtration unterbricht man die Verbindung zum Aspirator und trennt das Aufnahmegefäß von der Wulffschen Flasche. Alsdann füllt sich das auf den Boden der Sammelflasche

ragende Glasrohr selbsttätig mit der Flüssigkeit und diese kann nach Wegnahme des Schlauches von der Glasspitze in Gefäße abgezapft werden.

Die Filtrierabfüllvorrichtung von Uhlenhuth & Weidanz[15] (Fig. 140) zur sterilen Filtration besteht aus der Berkefeldschen Kerze (*a*), die mittels eines Gummistopfens auf der Saugflasche (*b*) angebracht ist. Das zu einer Röhre ausgezogene untere Ende ist graduiert. Die Saugflasche zeigt unter dem Hals ein Ansatzrohr, das

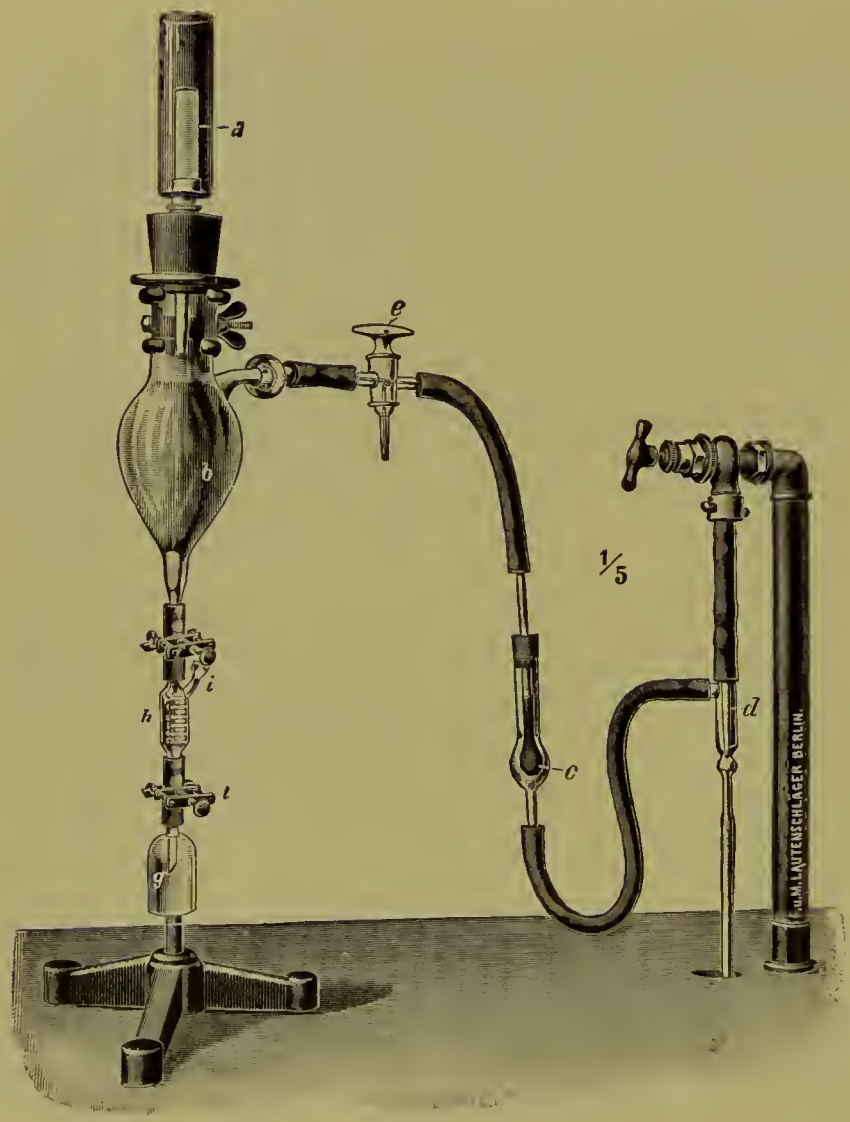


Fig. 140.

mit einer Kugel behufs Aufnahme von Watte versehen ist und steht mit der Wasserstrahlpumpe (*d*) in Verbindung. Um ein Eindringen von Wasser in die Saugflasche zu vermeiden, ist das Rückschlagventil (*c*) eingeschaltet. Zur Regulierung des Luftdruckes in die Saugflasche dient der Dreiwegehahn (*e*). Um die beim Oeffnen des Dreiwegehahns einströmende Luft keimfrei zu erhalten, wird in die Kugel am Ansatz der Saugflasche Watte gesteckt. Außerdem befindet sich in der Glaskugel noch eine zweite kleinere Glaskugel mit nach hinten

gerichteten Oeffnungen, die ein direktes Einströmen der Luft in die Saugflasche verhindern. Der Abfüllhahn (*f*) ist mit einer umschmolzenen Hülle versehen und zeigt eine glockenförmige Erweiterung, die es gestattet, einen Bausch Watte einzuführen, der die Drehung des Hahnes nicht hindert, wohl aber ein Eindringen etwaiger Keime verhindern soll. Mit dem Abfüllhahn steht das genau graduierte Röhrchen (*h*), das oben zur Aufnahme von Watte zu einer Kugel ausgezogen ist, in Verbindung. Außerdem ist der Abfüllhahn noch so eingerichtet, daß auch mit Umgehung des Röhrchens (*h*) das Filtrat direkt abgefüllt werden kann. Das Abflußrohr (*g*) ist von einer angeschmolzenen Glasglocke umgeben; sie hat den Zweck, einmal durch Verschließen der Glasglocke mit Watte das Abflußrohr vor Infektion zu schützen und beim Abfüllen des sterilen Filtrats das Hineinfallen von Bakterien der Luft in die Abfüllröhrchen zu verhindern.

Ein Apparat zum kontinuierlichen Filtrieren unter Vakuum wird von der Firma Lautenschläger angefertigt (Fig. 141). Der Apparat besteht in seinen Hauptteilen aus einem Büchnertrichter *A*, 2 Scheidetrichtern *B* und *C*. Die Anwendungsweise ist die folgende:

Nachdem der Apparat an der Saugpumpe angeschlossen ist, werden die Hähne *D* und *E* geschlossen, Hahn *F* geöffnet und Trichter *B* und *C* evakuiert. Wenn Trichter *B* genügend gefüllt ist, wird Hahn *F* geschlossen. Hahn *D* wird hierauf zwecks Durchlassen des Filtrates in Trichter *C* um ein Viertel gedreht. Nach der Entleerung des Trichters *B* wird Hahn *D* um ein Viertel weiter gedreht, damit beim Oeffnen des Quetschhahnes *H* Luft in Trichter *C* eintreten kann. Durch Oeffnen des Hahnes *E* wird das Filtrat aus dem Scheidetrichter *C* in das darunterstehende Auffanggefäß befördert. Quetschhahn *H* und Hahn *E* werden sodann wieder geschlossen und Hahn *F* geöffnet. Auf diese Weise ist Trichter *B* beständig, Trichter *C* bis zur Füllung von *B* wieder unter Vakuum. Der Verbindungsschlauch ist mit *G*, das Sammelgefäß mit *J* bezeichnet.

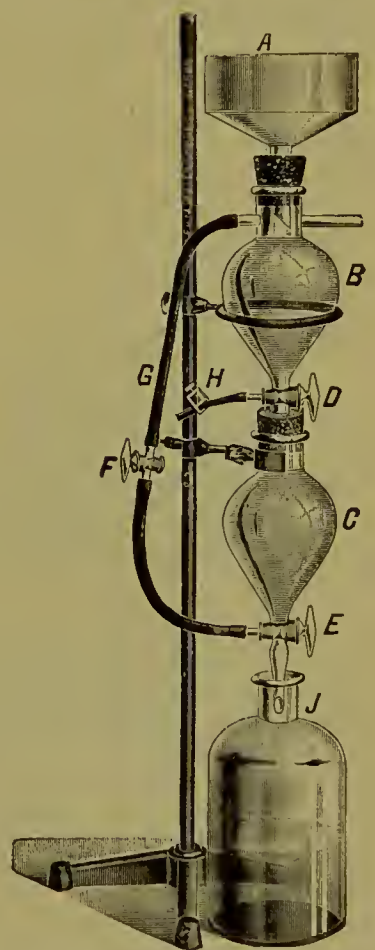


Fig. 141.

Ein zusammengestellter Filtrierapparat läßt sich in Dampf schlecht sterilisieren, da aus den Glasteilen die Luft nicht entweichen kann. Neisser hat deshalb den Filtrierapparat mit einem Dampfentwickler welcher mit Druck- und Temperaturregler verbunden ist, in Verbindung gebracht, und macht mittels des entwickelten Dampfes die ganzen Schlauchleitungen steril, ferner die Vorlageflasche, bestehend aus Filtrierflasche 500 g mit aufgesetztem Winkelrohr und Fickerschem Sandfiltrierrohr, welches dazu dient, um nach der Filtration keimfreie Luft in den Apparat zu lassen (Fig. 142).

Damit man das Zugießen von Zeit zu Zeit erspart, wird die Flasche mit der zu filtrierenden Lösung direkt auf die Chamberlandkerze gesetzt, und zwar geht durch den Stopfen der Flasche ein schräg abgeschliffenes Glasröhrchen, welches die Kerze immer bis auf ein bestimmtes Niveau gefüllt hält. Unten an dem Auffangegefäß befindet sich eine kleine Kugel mit Schlauch und Quetschhahn. Der Quetschhahn bleibt zunächst offen bis die Ausdampfung vorgenommen ist. Nach beendigter Ausdampfung wird der Quetschhahn geschlossen; bis zum Erkalten des Apparates sammelt sich in der Kugel das Kondenswasser an. Die Kugel wird dann abgezogen und der sterile Verschluß eingeführt.

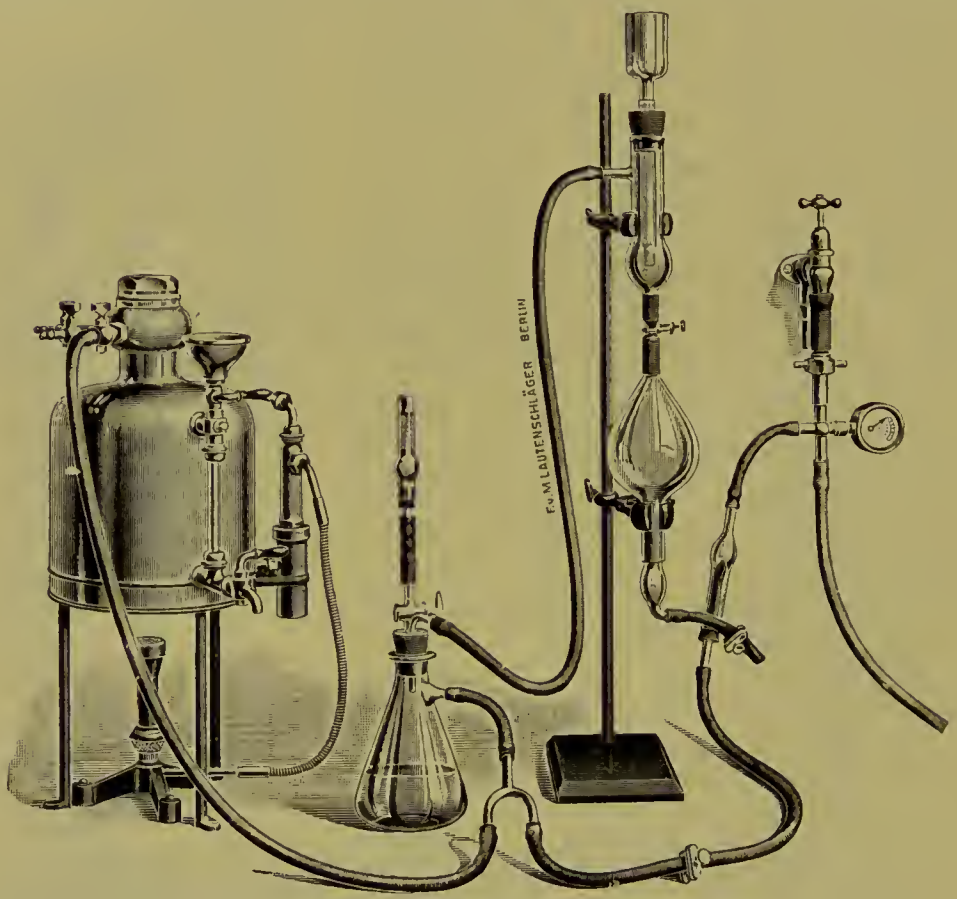


Fig. 142.

Der Filterapparat von Kern[9] besteht aus einer Porzellanschale, deren Boden in der Mitte durchbohrt ist und über dem Loch die Filterkerze enthält, deren oberes Ende blind endigt. Am unteren Ende befindet sich ein Ansatzrohr, welches in das Lumen der Kerze führt, die so auf eine Saugflasche montiert werden kann.

Durch Ueberstülpen der Kerze mit einem Becherglas kann ein völliges Abdichten der Kerze erzielt werden, so daß auch bei unvollkommener Füllung keine Luft durchzieht und das Vakuum nicht verringert wird. (Lautenschläger-Berlin.)

Bujwid[13] filtriert durch Asbestfilter, setzt dabei der Flüssigkeit ein kleines Quantum Asbestmasse zu und mischt diese damit.

Heim[17] hat folgenden Asbestfilter angegeben: Der Asbest befindet sich in einem unten offenen Zylinder. Die unter dem Asbest

befindliche Unterlage besitzt die Form eines Pilzes mit Durchlochung der schwach gewölbten Oberfläche. Die Siebplatte liegt demnach höher als der Boden des für die Aufnahme der zu filtrierenden Flüssigkeit bestimmten Gefäßes. Keime, die zwischen seiner Wand und der eingebrachten Asbestmasse in die Tiefe gedrungen sind, werden dort festgehalten und, falls sie die Neigung zum Aufsteigen haben sollten, sind sie daran durch die von dem pilzförmigen Siebtopf gebildeten vorspringenden Teile, die gleichzeitig der Filtermasse einen Halt gewähren, gehindert, so daß sie niemals nach der durchlochten Platte gelangen können. Die Asbestfasern werden mit Hilfe eines Holzstabes lückenlos rings um den Siebkörper bis etwa 2 bis 3 cm darüber eingestopft, dann drückt man sie mit einem Holzklotz fest, so daß die Dicke der endgültigen Filterschicht über dem höchsten Punkt des Siebkörpers 10 bis 15 mm beträgt. Die Einstopfung muß unter Wasser geschehen, mit dem man den Zylinder stets bis etwa zur Hälfte oder höher gefüllt hält.

Das Filter eignet sich für die Filtration fettfreier, wäßriger Flüssigkeiten und zum Auffangen von Stoffen, die in verunreinigten Wassern suspendiert sind. Der Apparat ist von E. & M. Lautenschläger in Berlin zu beziehen (nach Rosenthal für Bakterienfiltration nicht zuverlässig).

2. Vakuumdestillierapparate.

Um Flüssigkeiten, die Bakterien oder die leicht zersetzlichen Stoffwechselprodukte der Bakterien enthalten, einzuengen, kann man höhere Temperaturen wegen der leichten Veränderlichkeit dieser Substanzen nicht anwenden. Man nimmt vielmehr die Eindampfung im Vakuum bei niederen Temperaturen vor. Vakuumdestillierapparate speziell für bakteriologische Zwecke sind unter anderen von Brieger, Proskauer sowie Behring beschrieben.

Vakuumdestillierapparat nach Brieger (Fig. 143). Der doppelwandige Behälter *A* wird durch den seitlichen Tubus mit Wasser gefüllt, bis dasselbe in der Höhe des kleinen Ansatzrohres *R* steht. Die einzuengende Flüssigkeit kommt alsdann in einer Schale in das Innere von *A* und es wird mittels der Flügelschrauben *S* der Helm *H* aufgesetzt, der, um den Einblick in den Innenraum zu ermöglichen, zwei Glasaugen trägt. In einem Tubus des Helmes befindet sich luftdicht eingelassen ein Thermometer *T*, dessen langes Unterteil in das Innere hineinragt; in eine zweite Oeffnung des Helmes ist ein Glasrohr *C* eingelassen, das umgekehrt U-förmig gebogen ist und auf der anderen Seite mittels eines Gummipfropfens in ein mit Schwefelsäure gefülltes Gefäß mündet. Durch eine zweite Bohrung des Gummipfropfens geht ein anderes, durch einen Hahn verschließbares Rohr, das in eine kapillare Spitze nach außen mündet. Dieser Teil des Apparates dient zur Zufuhr getrockneter Luft. Man läßt während des Destillierens stets geringe Mengen von Luft über die Flüssigkeit streichen, um die Destillation zu beschleunigen und ein starkes Schäumen der Flüssigkeit zu verhindern. Ein dritter Tubus im Helm dient zum Einsetzen eines Tropftrichters, durch den kontinuierlich Flüssigkeit dem Apparat zugelassen werden kann. Durch ein seitliches Rohr *D* ist der Apparat über eine Wulffsche Flasche mit Vakuummeter mit der Wasserstrahlpumpe verbunden. Soll auch

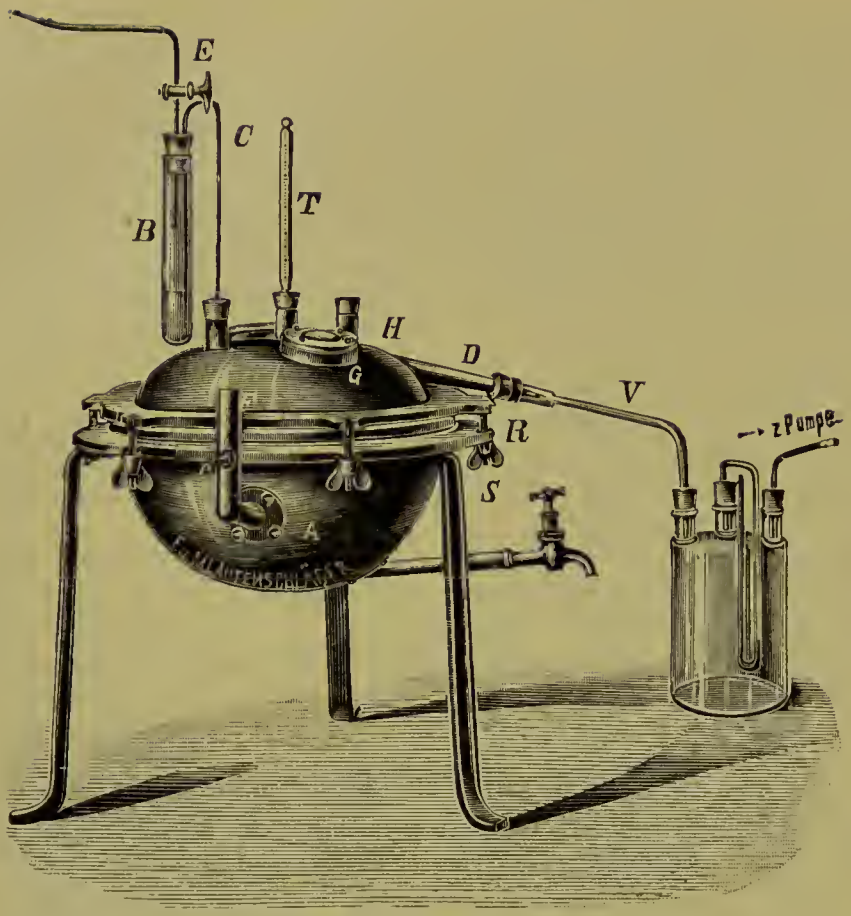


Fig. 143.

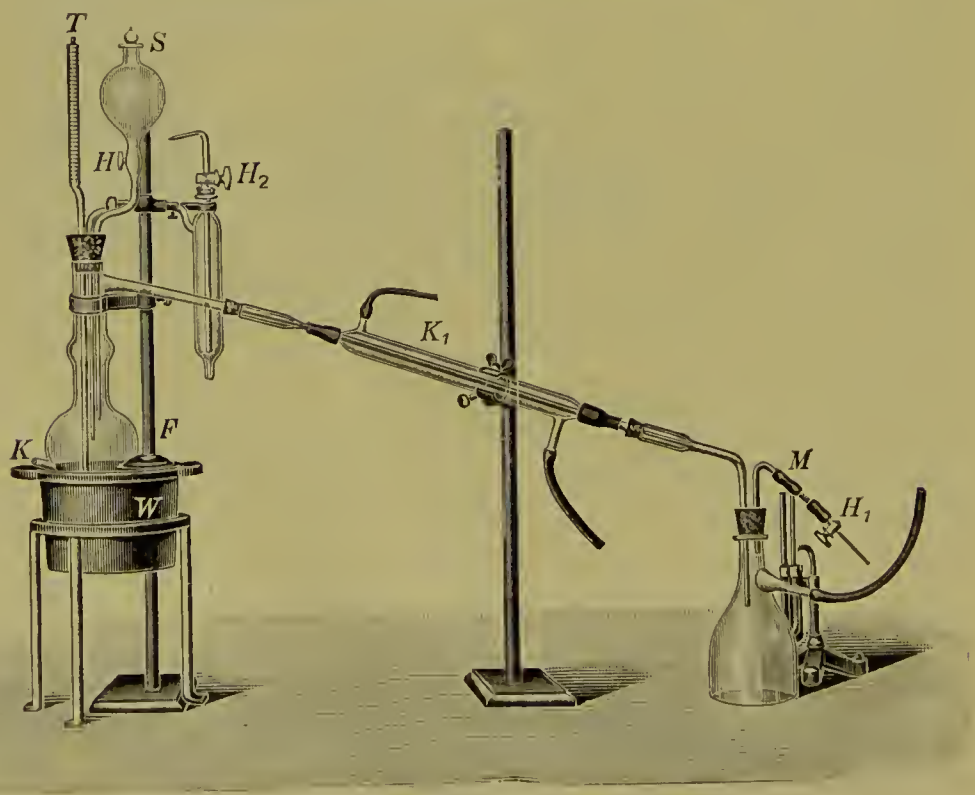


Fig. 144.

das Destillat weiter untersucht werden, so ist zwischen *D* und *V* ein Liebigscher Kühler einzuschalten. Um den Einblick in das Innere zu ermöglichen, bringt man vor das eine Schauglas ein brennendes Streichholz und sieht in das andere hinein. Man umdeckt den Helm noch, während sich der Apparat in Tätigkeit befindet, mit einem Ueberfalldeckel, wodurch ein doppelwandiger Raum entsteht, den die Heizgase passieren; dadurch wird eine gleichmäßige Erwärmung des Deckels gewährleistet und eine übermäßige Kondensation der aufsteigenden Dämpfe am Deckel verhindert. Die Flamme zur Erwärmung wird unter *A* gestellt.

Einfacher und mit Hilfe der im Laboratorium vorhandenen Glasgeräte leicht zusammenzustellen ist der folgende Apparat von Proskauer (Fig. 144). In dem zur Aufnahme der Flüssigkeit bestimmten Kolben *K*, der an seinem Halse erweitert ist, sitzt ein dreifach durchbohrter Gummipfropfen, in den dieselben Nebenapparate eingesetzt sind, die beim Briegerschen Modell in die Tubulaturen des Helmes eingelassen waren, nämlich das Thermometer *T*, der zum Zulassen der Flüssigkeit bestimmte Tropftrichter *S* mit dem Hahn *H* und das Luftzuführungsrohr mit der mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllten Vorlage H_2. Der Kolben steht auf einem Wasserbad *W*, das von unten erwärmt wird. Die im Kolben sich entwickelnden Dämpfe gelangen durch das seitliche Ansatzrohr in den Kühler K_1, wo sie kondensiert werden und in die Saugflasche abtropfen. Die Saugflasche ist über eine Wulffsche Flasche mit der Wasserstrahlpumpe, und mittelst eines *T*-Rohres mit dem Quecksilbermanometer *M* und einem Lüftungshahn H_1 verbunden. Sobald der Apparat evakuiert ist, wird das Wasserbad auf die gewünschte Temperaturhöhe gebracht und die Flüssigkeit durch den Hahn *H* zugelassen. Am Schluß der Einengung löscht man die Flamme, stellt die Pumpe ab und öffnet vorsichtig den Hahn H_1. Die Sterilisation des Apparates erfolgt durch Durchspülen mit Alkohol, der vor dem Einfüllen der Flüssigkeit durch Verdampfen entfernt werden kann.

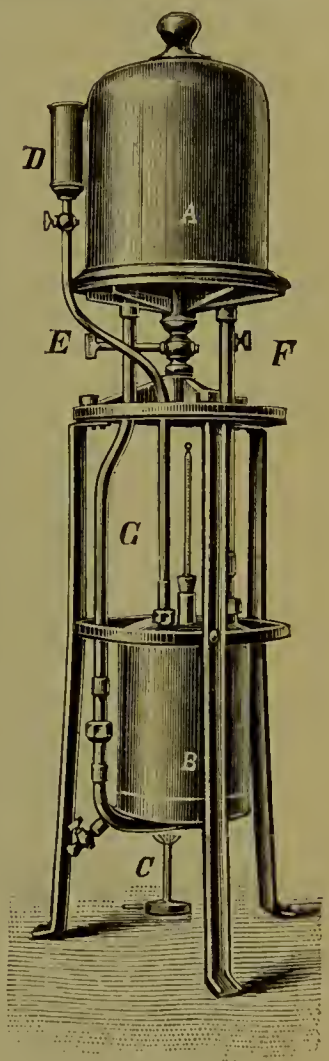


Fig. 145.

Der **heizbare Vakuumtrockenapparat** von Proskauer (Fig. 145) dient dazu, Substanzen bei niederer Temperatur zu trocknen oder Flüssigkeiten einzuengen. Der Apparat besteht aus einem Vakuumexsikkator mit doppelwandiger Erwärmungskammer, der im Innern der Glocke *A* gelegen ist. In das Innere des Exsikkators werden die mit dem einzuengenden Material gefüllten Gefäße gestellt und ferner Gefäße mit Schwefelsäure, um den sich entwickelnden Wasserdampf zu absorbieren. Der zweite Hauptbestandteil des Apparates ist das Expansionsgefäß *B*, das durch die Flamme *C* erwärmt wird. In das Expansionsgefäß mündet oben das Rohr *D* ein, durch das

das Gefäß mit Wasser gefüllt wird und in dem das sich ausdehnende Wasser beim Erwärmen ansteigt. In den Deckel des Expansionsgefäßes ist ferner das Rohr F eingelassen, durch das das warme Wasser zur Erwärmungskammer von A steigt. Nach Abgabe

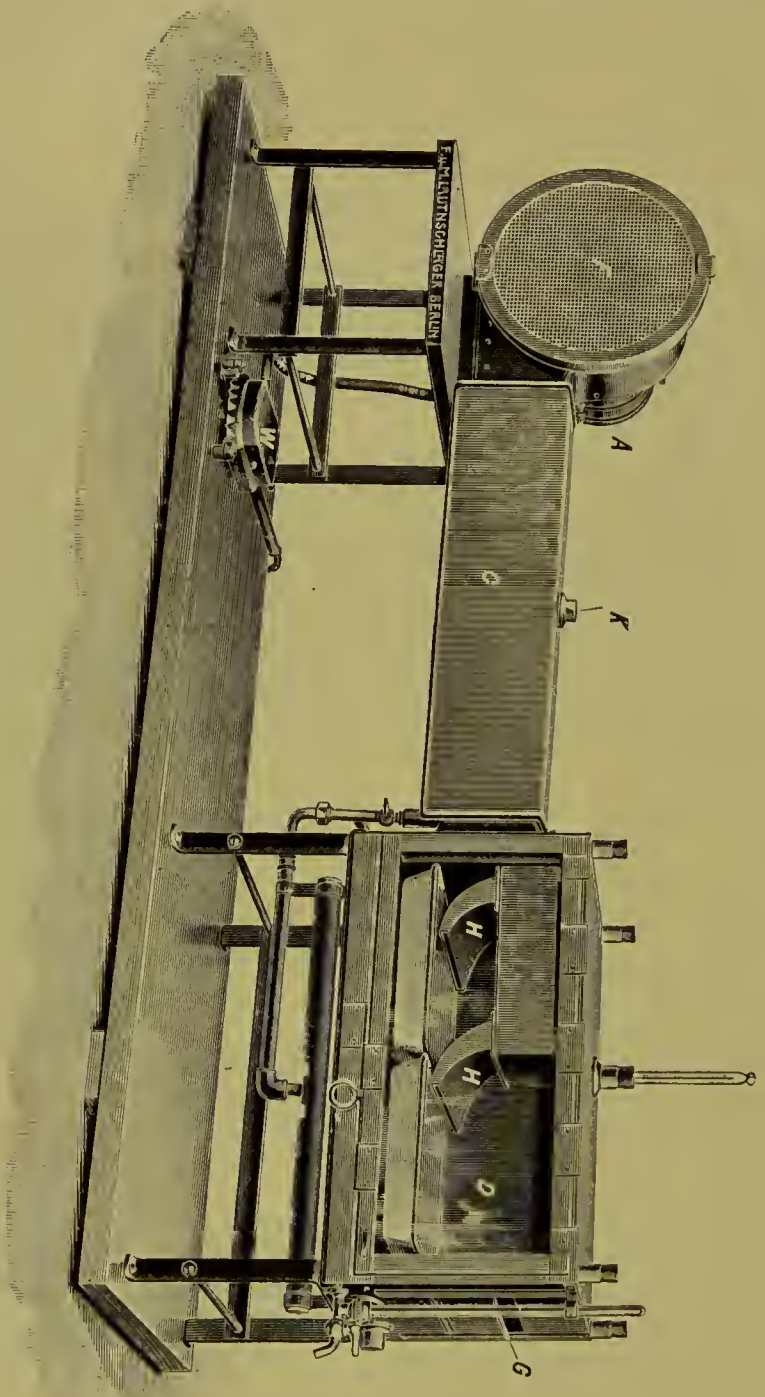


Fig. 146.

seiner Wärme sinkt es dann wieder durch das Rohr G zum Expansionsgefäß zurück. Nach der Evakuierung von A wird der Hahn E geschlossen. Ist die nötige Temperatur und Luftverdünnung erreicht, so kann der Apparat nach Kleinerstellung der Flamme ohne Aufsicht gelassen werden und arbeitet automatisch weiter.

Ersatz für die Vakuumtrockenapparate ist durch den Eindampfungsapparat nach Faust-Heim gegeben (Fig. 146).

Er arbeitet nicht mit Vakuum, ermöglicht aber trotzdem ein schnelles und sicheres Eindampfen der empfindlichsten Flüssigkeiten bei beliebigen Temperaturen, indem entsprechend vorgewärmte Luft über die Flüssigkeitsmenge hingeführt wird. Er besteht aus einem Luftansauger mit elektrischem Antrieb *A*, einer Vorwärmekammer für die Luft *C* und dem eigentlichen Trockenapparat *D*. Der mittels *A* erzeugte Luftstrom wird durch ein Wattefilter *F* filtriert und nach der Vorwärmekammer *C* geschickt, gelangt von hier nach dem Trockenapparat *D*, in dem sich die Schalen zur Aufnahme der Flüssigkeiten befinden. Mit dem Trockenapparat nach Faust-Heim ist man in der Lage, unter aseptischen Kautelen zu arbeiten.

3. Hydraulische Presse.

Um die Leibessubstanzen der Bakterien unter Ausschluß chemischer Agentien rein zu erhalten, verreibt Buchner[2] die feuchte Bakterienmasse mit Infusorienerde und Quarzsand und preßt sie mit Hilfe einer hydraulischen Presse (Fig. 147) bei 300—500 Atmosphären Druck aus.

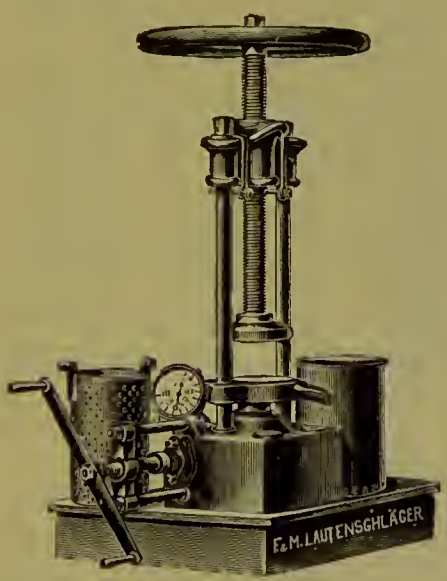


Fig. 147.

Fig. 148.

4. Dialysatoren.

Zur Befreiung von Bakteriensuspensionen oder Flüssigkeiten von Salzen benutzt man die Dialysatoren, von denen für bakteriologische Zwecke der Dialysator nach Proskauer (Fig. 148) sehr empfehlenswert ist. Das Rohr *a* des Apparates wird mit der Wasserleitung verbunden, das Wasser tritt in das Gefäß *B* und verläßt dasselbe

durch das Rohr *R*. In dem Hals des Gefäßes *B* sitzt das Gefäß *C*, das unten durch den Pergamentbeutel *P* abgeschlossen ist. Die Einführung der Flüssigkeit in *P* geschieht durch den mit Wattepfropf verschlossenen Hals von *C*.

Von Schleicher & Schüll sind besondere Pergamenthülsen zur Dialyse in den Handel angebracht; sie sind im Dampf sterilisierbar und werden nach der Einfüllung der Flüssigkeit am oberen Ende mit Watte verschlossen. Ueber Dialysierhülsen aus Kollodium siehe oben.

Fig. 149a.

5. Zentrifugen.

Um in Flüssigkeiten suspendierte Bakterien von der letzteren zu trennen, bedient man sich der Zentrifuge (Betrieb durch die Hand, durch Wasser oder Elektrizität [Fig. 149a und b]).

Um einen ruhigen Gang und geringste Abnutzung zu gewährleisten, müssen die Zentrifugen vor der Inbetriebsetzung auf das Genaueste ausbalanziert sein, d. h. je zwei aneinander gegenüberliegende Zentrifugengläschen müssen mittelst einer Wage auf genau das gleiche Gewicht gebracht werden.

Da bei der hohen Tourenzahl eine beträchtliche Gefahr für die Umgebung durch zufälliges Zerbrechen eines Röhrchens usw. besteht, sind die Zentrifugen mit einem festen Mantel umgeben, der entweder feststeht oder mit den Zentrifugenröhrchen zusammen um seine Achse rotiert. Der Gang der Zentrifuge wird durch den Mantel ein ruhigerer und schnellerer.

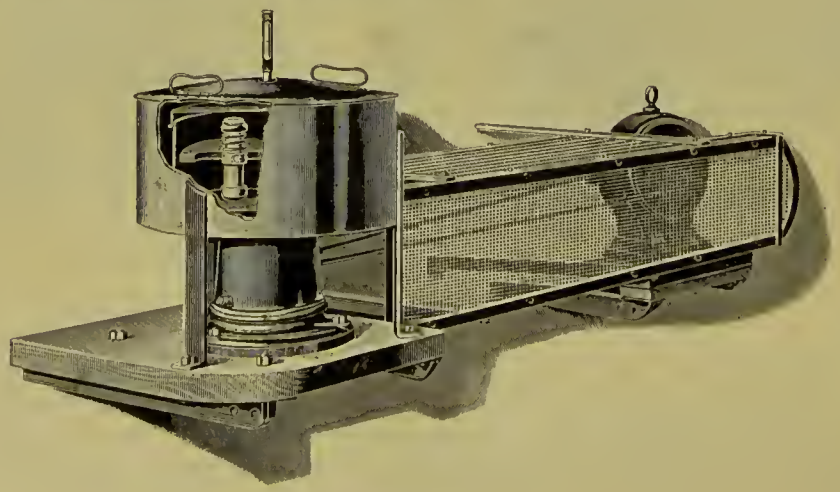


Fig. 149b.

Wasserzentrifugen haben in der Regel eine Tourenzahl von 1500 bis 1800 Umdrehungen in der Minute, Zentrifugen mit elektrischem Antrieb leisten bis zu 8000 Touren.

Gemessen wird die Schnelligkeit mit einem Tourenzähler (Gyrometer), der in die Achse der Zentrifugen eingebaut ist und aus einem mit Alkohol teilweise gefülltem Glasrohr besteht. Bei den Umdrehungen nimmt die über dem Alkohol stehende Luftblase eine mehr oder weniger langgestreckte Form an, die mittels einer eingeschliffenen geeichten Skala gemessen werden kann.

6. Schüttelapparate.

Schüttelapparate dienen in der Bakteriologie zu den mannigfachsten Zwecken. Modelle sind in großer Anzahl von verschiedenen Autoren angegeben worden. Der Uhlenhuthsche[14a]

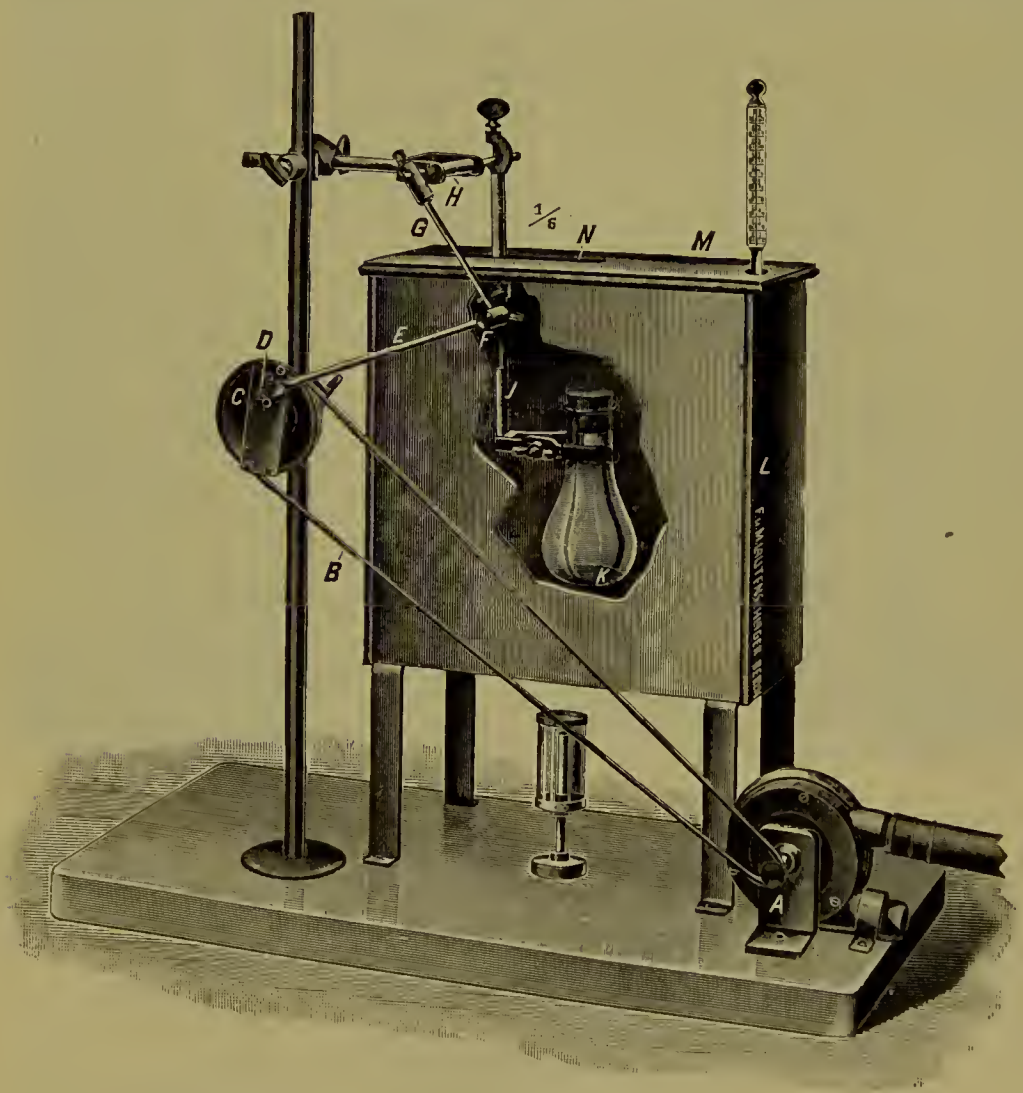


Fig. 150.

Schüttelapparat (Fig. 150) gestattet auch bei höheren Temperaturen zu schütteln: Er besteht aus dem mit der Wasserleitung verbundenen Antriebsmotor *A*, von dem aus durch eine Schnur *B* eine Kraft-

übertragung nach der Scheibe *C* stattfindet. Die rotierende Bewegung der Scheibe *C* wird durch das Gestänge *E*, *G*, *J* in eine schwingende umgesetzt, die Stange *J* trägt eine Klemme, durch die Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben gehalten werden können. Die Schwingungsanzahl kann auch durch Verstellen der Stange *E* bei den Löchern *D* und des Klobens variiert werden. Um den schüttenden Teil des Apparates mit dem zu schüttelnden Gefäß ist ein Wasserbad angebracht, das mittels eines Mikrobrenners auf beliebige Temperaturen erwärmt werden kann. Der Apparat ist von der Firma Lautenschläger-Berlin zu beziehen.

7. Kugelmühlen.

Zur Zerkleinerung von trockenen Bakterien bedient man sich der Kugelmühlen. Diese bestehen im wesentlichen aus dickwandigen, fest verschlossenen Behältern, die aus Metall, Porzellan oder Glas angefertigt sind und im Innern harte Kugeln aus Stahl,

Fig. 151.

Achat oder Porzellan enthalten. Durch einen Motor wird der Apparat in eine rotierende Bewegung gesetzt. — Von den vielen angegebenen Modellen sei auf die kleine Kugelmühle von White[16] hingewiesen, die für die meisten Ansprüche genügen dürfte. Ein Motor von $^1/_{12}$ Pferdekraft bewirkt den Antrieb (Fig. 151).

8. Isolierkammer.

Beim längeren Arbeiten mit lebenden Reinkulturen hochvirulenter, stark pathogener Mikroorganismen (Tuberkelbacillen, Pestbazillen, Rotzbacillen etc.) bedient sich zweckmäßig einer Isolierkammer. Die von Parker Hichens[8] angegebene Kammer (Fig. 152) besteht aus einem viereckigen Glaskasten, dessen Vorderwand

in zwei Teile geteilt ist. An dem Unterteil, der sich entfernen läßt, sind zwei armdicke Oeffnungen angebracht, an denen je ein langer Gummihandschuh befestigt ist. Durch eine Absaugpumpe kann die Luft in der Kammer erneuert werden. Die eintretende Luft

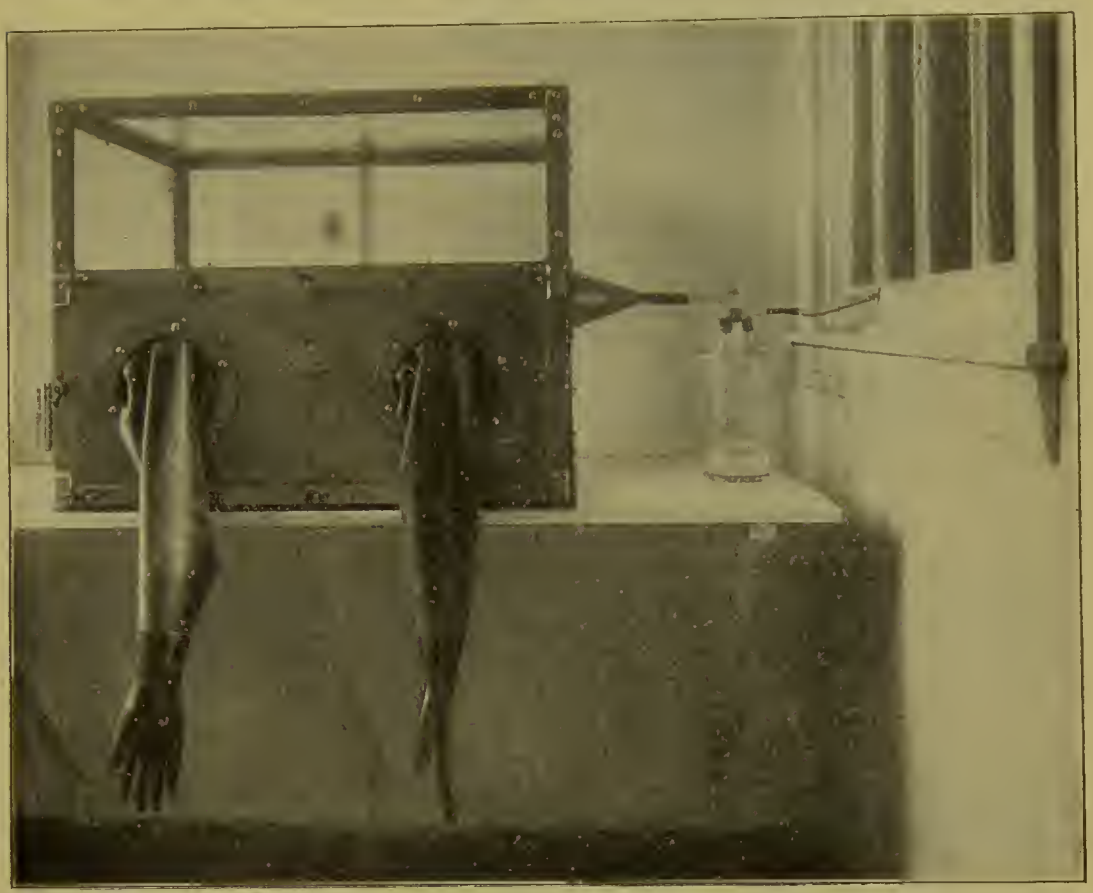


Fig. 152.

passiert hierbei einen Filter, die austretende eine mit einem Desinfizienz gefüllte Waschflasche. Vor der Oeffnung der Kammer wird das Innere durch Formalindämpfe desinfiziert und diese nach genügend langem Einwirken mittels der Absaugpumpe beseitigt.

9. Kühleinrichtungen.

Für Temperaturen bis zu 8° genügen i. R. die in jeder Wirtschaft gebräuchlichen Eisschränke (Oberkühlung).

Mehr als die Eisschränke leisten die zuerst von Morgenrot angegebenen Frigoapparate (Fig. 153). Sie bestehen aus einem gut isolierenden großen Holzbehälter, in dem sich das eigentliche Aufnahmegefäß für die zu kühlenden Objekte befindet. Letzteres ist von einer Kältemischung unmittelbar umgeben, die man sich aus zwei Teilen kleingeschlagenen Eises und einem Teil Viehsalzes herstellt.

Für kleinere Laboratorien ist der Gebrauch von eigens für medizinische Zwecke gebauten, von Reiter angegebenen Thermosgefäßen vorzuziehen (Fig. 154). Der Apparat, der unter dem Namen Opsonizer

bekannt ist, weil zuerst für opsonische Untersuchungen bestimmt, trägt an seinem Deckel einen Thermometer, an dem man jederzeit

Fig. 153.

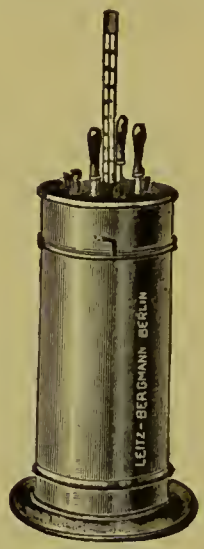


Fig. 154.

die in dem Gefäß vorhandene Temperatur ablesen kann. Zum Gebrauch wird das Gefäß mit obiger Kältemischung und mit den zu kühlenden Gegenständen beschickt. (Zu beziehen von E. Leitz, Berlin.)

Literatur zum VII. Kapitel.

1. Arloing, Compt. rend. de l'acad., T. 114, 1892.
1a. Bechold, Zeitschr. f. Chem. d. Kolloide, Bd. 2, 1907.
2. Buchner, Münch. med. Wochenschr., 1897, Nr. 12.
3. Bujwid, Centralbl. f. Bakt., Bd. 44, H. 2, 1907.
4. Chamberland, Compt. rend. de l'acad., 1884.
5. Dachnieswky, Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., Bd. 16, 1894.
5a. v. Esmarch, Ebenda, Bd. 32, 1902.
6. Giemsa & Prowazek, Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 29.
7. Heim, L., Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., Ref., Bd. 38, 1906,
8. Hitchens, Parker, Centralbl. f. Bakt., Bd. 49, H .1, 1909.
8a. Hofstädter, Arch. f. Hyg., Bd. 53, 1905.
9. Kern, F., Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, H. 2, 1905.
10. Nordtmeyer, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 10, 1891.
11. Pasteur & Joubert, Compt. rend. de l'acad., T. 84, 1877.
12. Pawlowsky & Gladin, Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., Bd. 18, 1895.
13. Rosenthal, Werner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 45, H. 6, 1908.
13a. — Zeitschr. f. Hyg., Bd. 60, 1908.
13b. Schmidt, P., Ebenda, Bd. 65, 1910.
14. Sirotinin, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 4, 1889.
14a. Uhlenhuth, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 2, 1909.
15. Weidanz, Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, H. 6, 1908.
16. White, Benjamin, Centralbl. f. Bakt., Bd. 48, H. 2, 1909.
17. v. Wunschheim, Desinfektion, Jahrg. II, 1909.

Soweit die Abbildungen der vorstehenden Abhandlung nicht den betreffenden Originalarbeiten entnommen sind (zum Teil verkleinert), sind uns die Vorlagen von einer Reihe von Firmen in dankenswerter Weise überlassen worden.

LONDON SCHOOL OF HYGIENE AND TROPICAL MEDICINE
LIBRARY
1 JUN 1987